

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM



ПЬЕТРО ВОЛЬПЕ
**Биохимия
клеточного
цикла**

проблемы канцерогенеза и химиотерапии





PIETRO VOLPE

**Biochimica
del ciclo
cellulare**

Problemi di cancerogenesi e di chemioterapia

Napoli, 1977

Conferenza tenuta il 12 marzo 1976 nell'Istituto per lo Studio e la Cura dei Tumori di Napoli su invito della Sezione Campana della Società Italiana di Ematologia

ПЬЕТРО ВОЛЬПЕ

**Биохимия
клеточного
цикла**

Перевод с итальянского
канд. биол. наук М. Я. Тимофеевой
под редакцией
д-ра хим. наук Е. С. Северина

**Издательство «Мир»
Москва 1979**

Книга, написанная известным итальянским биохимиком и молекулярным биологом, представляет собой обзор основных данных по различным вопросам биосинтеза нуклеиновых кислот и белков на разных стадиях клеточного цикла. Автор в очень ясной и сжатой форме излагает оригинальные соображения о взаимозависимости протекающих в клетке процессов, о возможных механизмах регуляции клеточного цикла в норме и при вирусных инфекциях, связывая все это с проблемами канцерогенеза и химиотерапии опухолей.

Предназначена для молекулярных биологов, биохимиков, цитологов, вирусологов, медиков и других специалистов, интересующихся проблемами клеточного цикла и канцерогенеза.

Редакция литературы по биологии

2605070000

В $\frac{21005-118}{041(01)-79}$ 118—79

© 1977, Editrice Cooperativa Libreria Universitaria, Napoli

© Перевод на русский язык, «Мир», 1979

Предисловие к русскому переводу

Книга итальянского ученого профессора Пьетро Вольпе посвящена рассмотрению биохимии клеточного цикла. В доступной форме автор излагает общие вопросы биологии нормальной и раковой клетки, молекулярной биологии последовательных этапов передачи генетической информации (репликации, транскрипции и трансляции). Все эти процессы автор анализирует по стадиям клеточного цикла, рассматривая их в системе «временных орбит». Особое внимание П. Вольпе уделяет проблеме модификации ДНК и ее возможной роли в регуляции транскрипции, а также разбору механизмов вирусной инфекции и химиотерапии рака. Небольшой объем книги не позволил охватить все работы по рассматриваемым проблемам; в ней представлены и интересно обсуждаются результаты, полученные в основном в лаборатории самого автора. В книге излагаются также оригинальные молекулярнобиологические концепции и гипотезы П. Вольпе относительно регуляции процессов передачи генетической информации в клеточном цикле, механизма вирусной инфекции и возможных подходов к химиотерапии рака.

Книга представляет безусловный интерес и должна найти широкий отклик не только у молекулярных биологов, но и у специалистов, работающих в смежных областях, — биохимиков, медиков, врачей-клиницистов.

*Е. С. Северин
М. Я. Тимофеева*

Предисловие

В качестве президента Кампанийской секции Итальянского общества гематологов я имел честь пригласить профессора Пьетро Вольпе — известного в международных научных кругах биохимика — провести семинар в Научно-исследовательском и лечебном онкологическом институте в Неаполе, где впервые были предприняты попытки химиотерапии рака. Его фундаментальные исследования в области молекулярной биологии клеточного цикла и взаимодействия вируса с клеткой-хозяином являются очень важными и для врачей, работающих в области онкологии и гематологии. Именно поэтому после обмена мнениями была выбрана тема «Клеточный цикл, онкогенез и химиотерапия». Эти вопросы и явились предметом обсуждения с врачами, биологами, химиками и физиками, причем они рассматривались не только на уровне «чистой» науки. Семинар был организован таким образом, что оказался доступным для широкого круга лиц, заинтересовавшихся его увлекательной тематикой.

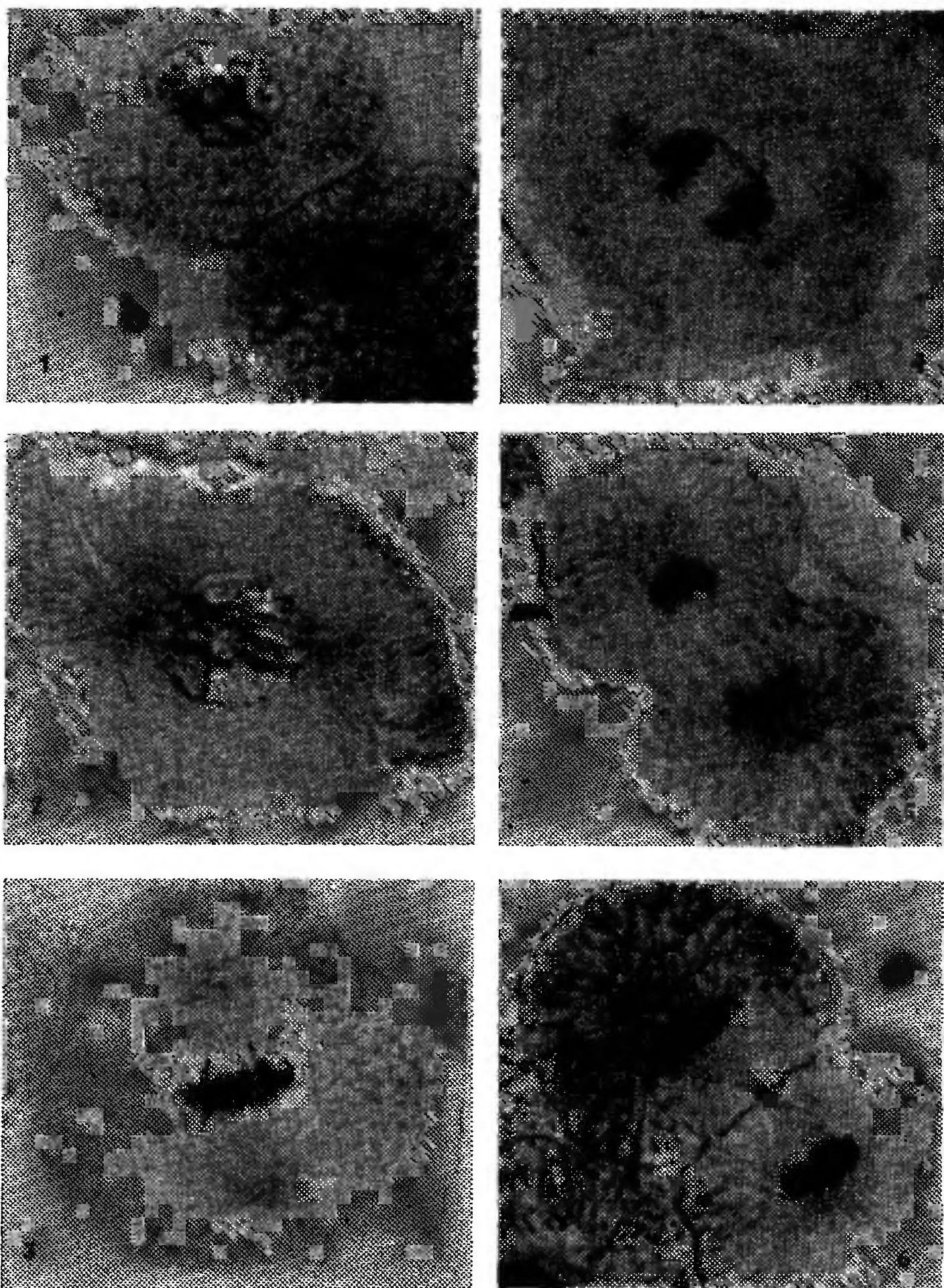
Настоящая книга, в виде которой публикуются прочитанные на семинаре лекции, свидетельствует о том значении, которое придается обмену идеями между фундаментальной и прикладной науками, особенно сегодня — в эпоху, когда снова наметилась тенденция более активного использования научных результатов в клинике.

Автор излагает биохимию жизненного цикла эукариотической клетки в норме и после вирусной инфекции, а также рассматривает попытки воздействия на раковую клетку с помощью химических препаратов с учетом закономерностей протекания различных процессов в клеточном цикле.

С точки зрения терапии особый интерес представляет мысль об использовании лекарственных веществ, действие которых специфично в отношении определенных фаз жизненного цикла клетки. Это позволяет надеяться на осуществление предсказаний Эрлиха относительно химиотерапии, избирательно направленной на болезнетворных агентов, которыми для Эрлиха были микроорганизмы, а в нашем случае являются раковые клетки.

В связи с этим усилия химиотерапии направлены на комбинирование лекарственных веществ, производимое скорее эмпирически, нежели научно обоснованно, для достижения максимальной избирательности поражения раковых клеток. Можно ожидать, что сотрудничество между разными дисциплинами с учетом достижений в фундаментальных и прикладных областях ускорит приближение к этой цели.

Профессор Антонио Каяно
Онкологический институт в Неаполе



Кариокинез. 1 — клеточное ядро в интерфазе содержит неуплотненные хромосомы; 2 — в профазе появляются видимые хромосомные нити, в то время как ядерная мембрана начинает исчезать; 3 — в метафазе хромосомы конденсируются, образуя так называемую экваториальную пластинку; 4 — в анафазе образуется митотическое веретено; 5 — веретено направляет миграцию хроматид к полюсам; 6 — в телофазе появляется мембрана между двумя дочерними клетками.

I. Введение

Тысячи врачей во всех странах мира ведут нелегкую борьбу против рака. Многие прибегают к хирургическому вмешательству. Другие больше доверяют лучевой терапии. Почти все призывают к мерам профилактики. Немало и тех, кто пытается найти химиотерапевтический подход. Но все испытывают значительное чувство неуверенности — из-за неэффективности оперативных вмешательств, из-за того, что положительный эффект облучения оказывается недолговременным, а лекарственные препараты не всегда действенны.

С другой стороны, особенно в больших городах, очень мало делается для очистки окружающей среды от тех веществ, которые статистика безоговорочно признает канцерогенными.

В больничных палатах пациенты, со страхом смотрящие в будущее, надеются на сенсационное открытие, которое спасет их от раковых опухолей.

Разумеется, в борьбе против рака наряду с клиницистами важнейшую роль играют исследователи, которые уже достигли в изучении онкогенеза значительных результатов.

В научных лабораториях остался позади период академических дискуссий относительно природы новообразований. Сейчас уже нет никаких сомнений в том, что и мутагенные агенты, и радиация, и опухолеродные вирусы — порознь или совместно — способствуют возникновению опухолей. Задача состоит сейчас в том, чтобы продолжать углубленное изучение биологии опухолей, стремясь в то же время к практическому использованию получаемых знаний. Вслед за головокружительным развитием *генетической инженерии*, безусловно, последует дальнейшее развитие химиотерапии рака.

У медиков и ученых-исследователей имеется общее поле деятельности — изучение *кинетики* нормальной и трансформированной клетки.

Каковы же перспективы этого нового направления?

Прежде всего это — преодоление барьеров: с одной стороны, фундаментальная наука стремится [2] удовлетворить требованиям медицины, способствуя разрешению ряда ближайших задач, с другой стороны, клиническая медицина обращается к фундаментальной науке, предлагая ей для анализа многочисленные результаты, полученные за последние годы.

Цель настоящей работы состоит в том, чтобы привлечь внимание медиков и биологов к проблемам *клеточной кинетики* — к *биохимии клеточного цикла* и ее значению для теории онкогенеза, с одной стороны, и для химиотерапии рака — с другой.

Содержание книги можно подразделить на несколько частей.

Вначале речь будет идти об экспериментальном методе, основанном на использовании синхронных клеточных культур.

Затем будут изложены различные факты с попыткой сформулировать общие закономерности регуляции генной активности в течение жизненного цикла эукариотической клетки [1]. В ходе исследований удалось установить, что кинетика нормальной клетки подчиняется ряду закономерностей. Эти закономерности, однако, нарушаются, если клетка вступает во взаимодействие с вирусом, — будет ли это *литический* вирус (вызывающий разрушение клетки) или *онкогенный* (трансформирующий клетку).

В заключение будет рассмотрена связь этих вопросов с проблемой химиотерапии опухолей.

1. Как выглядят клетки, культивируемые in vitro

На рис. 1 показан внешний вид клеток одной из линий, используемых в наших работах [3]. Это клетки HeLa — линии, происходящей из карциномы матки человека.

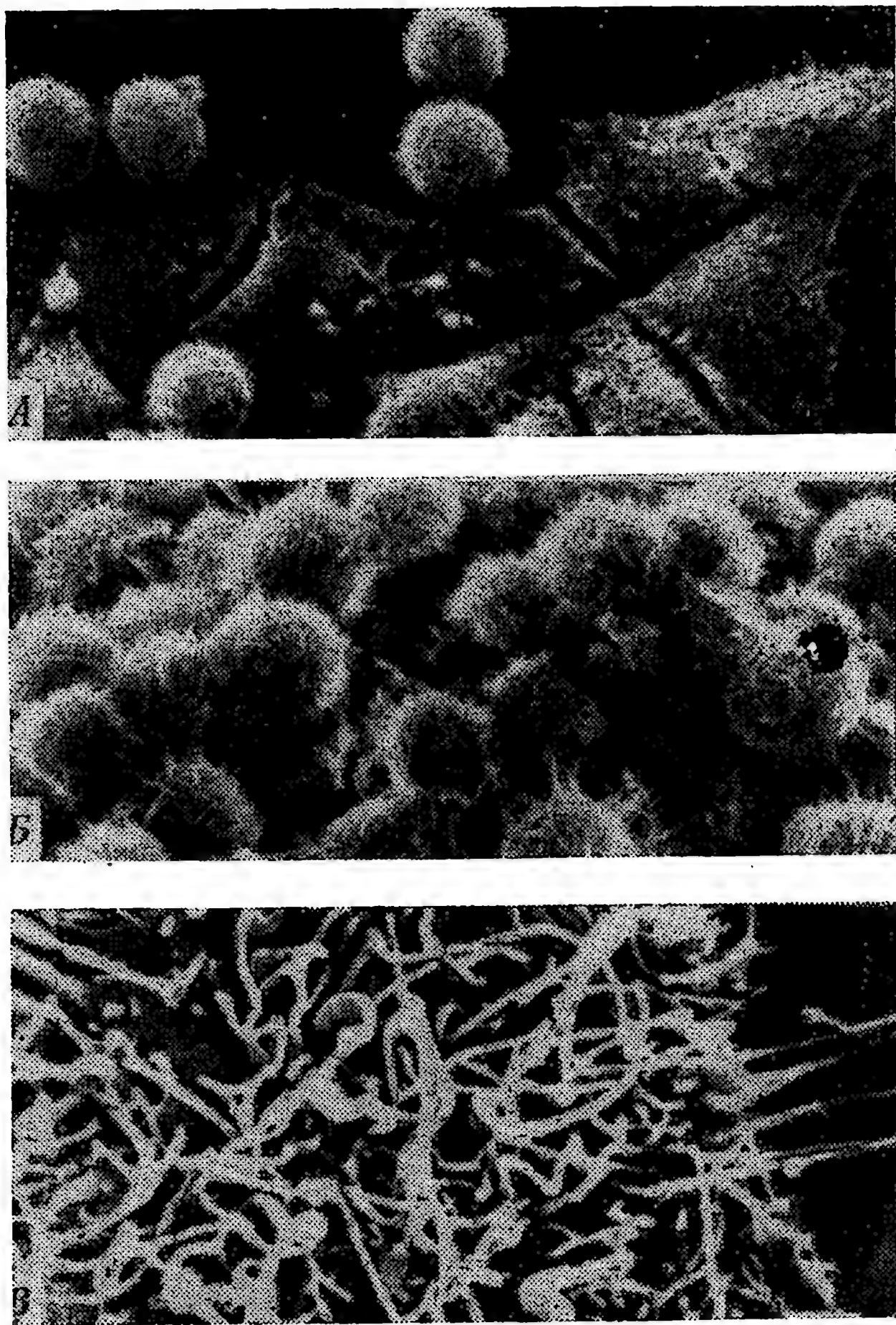


Рис. 1. Микрофотографии клеток HeLa, полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа [3]. А. Клетки, прикрепленные к дну чашки Петри; новообразованные клетки имеют сферическую форму; $\times 2000$. Б. Суспензионная культура. Все клетки приобретают сферическую форму; $\times 2000$. В. Микроворсинки; $\times 10\,000$.

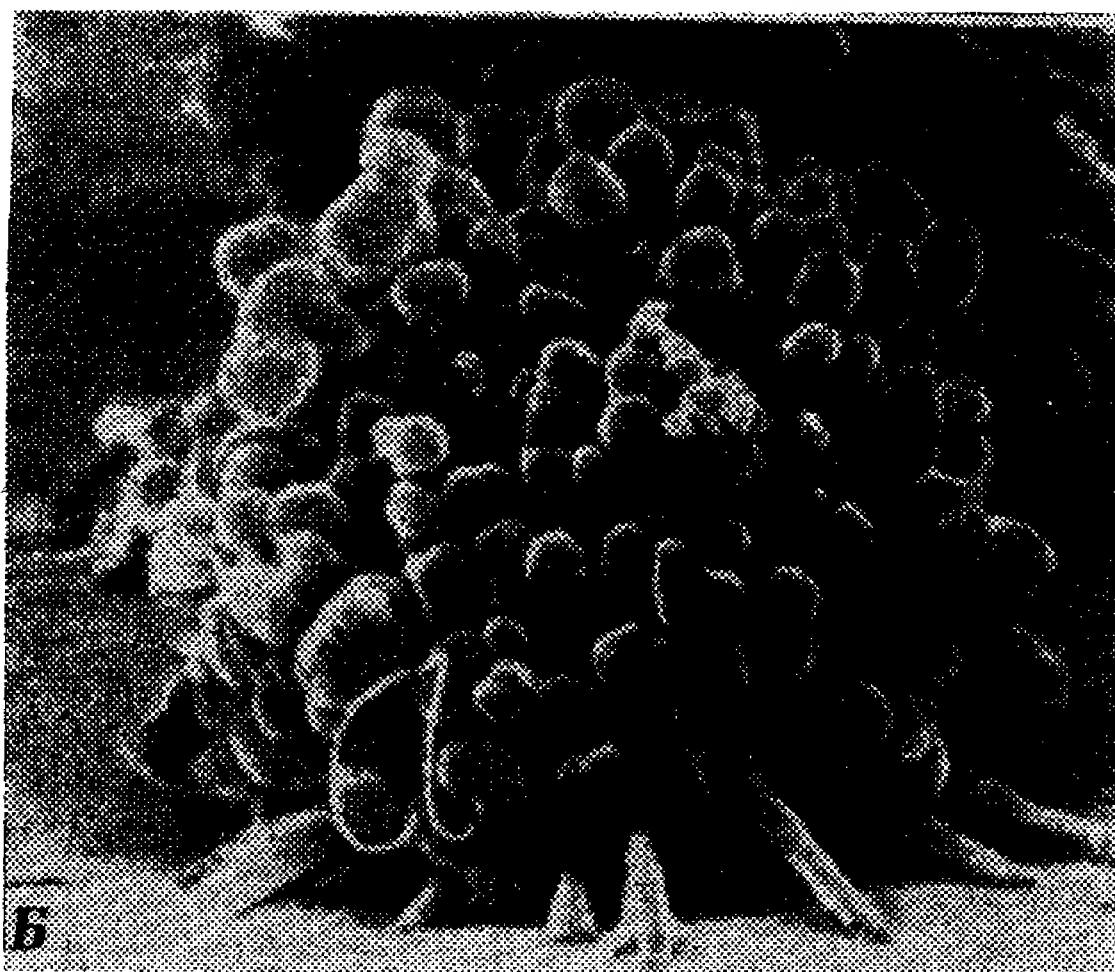
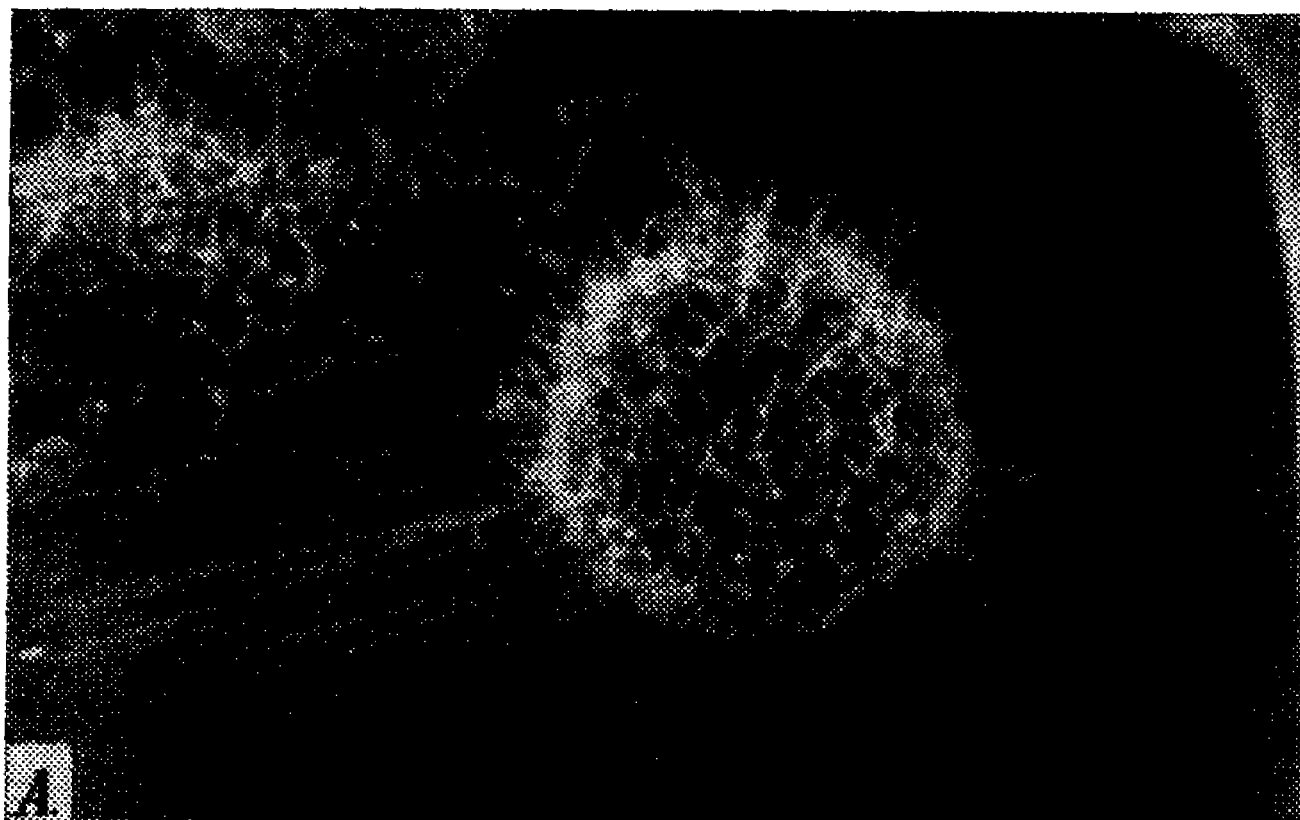


Рис. 2. Микроворсинки клеток HeLa. Микрофотографии, полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа [3]. А. Клетка, прикрепленная к субстрату в период митоза; $\times 2000$. Б. Утолщенные микроворсинки клетки в ранней фазе G_1 ; $\times 10\,000$.

In vitro эти клетки имеют уплощенную форму, если они растут в виде монослоя на твердом субстрате, и округлую — при росте в суспензии.

При исследовании с помощью сканирующего электронного микроскопа поверхность клетки оказывается отнюдь не гладкой, как можно было бы думать: она густо покрыта микроворсинками, число, форма и величина которых очень изменчивы. В отдельных случаях некоторые выпячивания могут связывать два отдаленных участка клеточной мембраны; через такой внешний мостик могли бы, видимо, сообщаться между собой даже различные компартменты цитоплазмы. На рис. 2 видно, что одна из возможных функций микроворсинок — прикрепление клетки к субстрату [3].

Большой интерес представляет вещество, образующееся в концевых расширениях микроворсинок; важно было бы также выяснить, какие изменения происходят в них при трансформации клетки в связи с утратой контактного торможения.

2. Микрокосм эукариотической клетки

Если внешнее строение клетки представляется таким сложным, то не менее интригующей оказывается ее внутренняя структура.

На рис. 3 показана внутренность клетки. Эта статическая картина невольно вызывает желание познать внутренний мир клетки в его динамике. Легко вообразить себе, как митохондрии, выполняя свою работу, движутся вокруг ядра, свободные рибосомы устремляются в те места, где происходит белковый синтез, ядерно-цитоплазматические потоки перекрещиваются во время образования и расщепления различных веществ. Можно предполагать, что внутри этого микрокосма действуют особые законы, регулирующие протекание всех этих процессов во времени и в пространстве.



Рис. 3. Схема микрокосма клетки. Хромосомы упакованы в ядре, которое сообщается с цитоплазмой через поры двойной ядерной мембраны; в цитоплазме находятся различные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, рибосомы — свободные и прикрепленные к цистернам — и др.); внешняя мембрана на схеме не нарисована, чтобы усилить «эффект пространства».

3. «Центральная догма» биологии

Бум 1965 года в биологии, генетике и биохимии [4] привел многих исследователей к мысли об особом значении временных отношений при изучении макромолекулярных синтезов, происходящих в отдельной клетке на протяжении ее жизни. Молекулярная биология уже рас-

<i>Второе основание</i>					
<i>Первое основание</i>	У	<i>Третье основание</i>			
		У	Ц	А	Г
	У	Фен	Фен	Лей	Лей
	Ц	Лей	Лей	Лей	Лей
	А	Иле	Иле	Иле	Мет
	Г	Вал	Вал	Вал	Вал

<i>Второе основание</i>					
<i>Первое основание</i>	Ц	<i>Третье основание</i>			
		У	Ц	А	Г
	У	Сер	Сер	Сер	Сер
	Ц	Про	Про	Про	Про
	А	Тре	Тре	Тре	Тре
	Г	Ала	Ала	Ала	Ала

<i>Второе основание</i>					
<i>Первое основание</i>	А	<i>Третье основание</i>			
		У	Ц	А	Г
	У	Тир	Тир		
	Ц	Гис	Гис	Ган	Ган
	А	Асн	Асн	Лиз	Лиз
	Г	Асп	Асп	Глу	Глу

<i>Второе основание</i>					
<i>Первое основание</i>	Г	<i>Третье основание</i>			
		У	Ц	А	Г
	У	Цис	Цис		Три
	Ц	Арг	Арг	Арг	Арг
	А	Сер	Сер	Арг	Арг
	Г	Гли	Гли	Гли	Гли

Рис. 4. Генетический код. Буквами кода служат четыре азотистых основания; каждая группа из трех оснований (триплет) кодирует определенную аминокислоту в белковой цепи. Вторая буква каждого триплета (У, Ц, А или Г — урацил, цитозин, аденин или гуанин) указана в верхнем левом углу соответствующего квадрата; первому основанию соответствуют буквы левого столбца, а третьему основанию — буквы верхней строки. Триплеты УАА, УАГ и УГА (незаполненные квадраты, не кодирующие аминокислоты, вероятно, играют роль «знаков препинания» при декодировании информации.

полагала некоторыми фундаментальными фактами, исходя из которых можно было вести дальнейшую разработку этих вопросов.

Генетическая информация записана в определенной последовательности пуриновых и пиримидиновых оснований в ДНК. Эта информация должна быть переписана

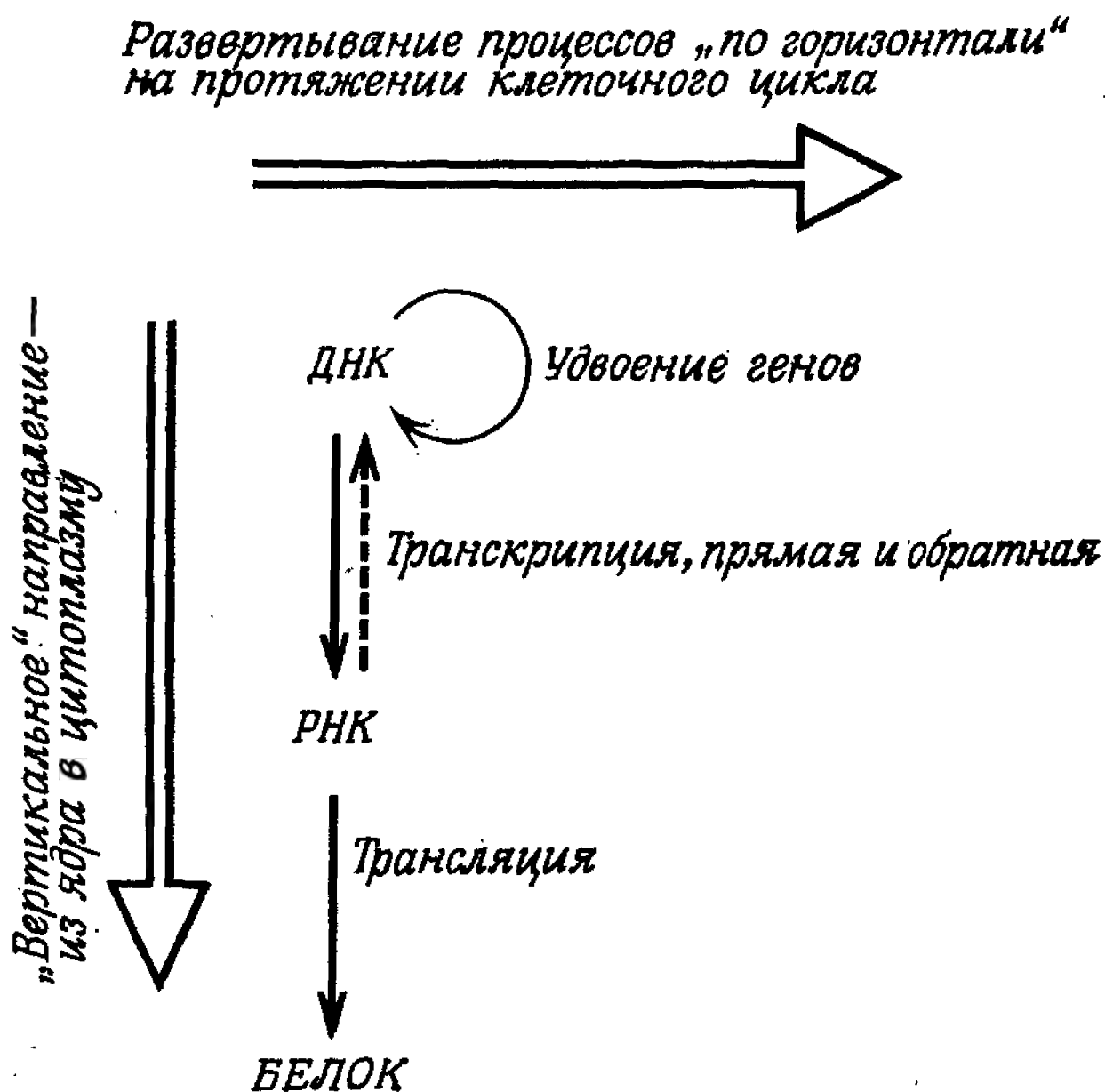


Рис. 5. Схема «вертикального» потока (из ядра в цитоплазму) генетической информации и ее разворачивания «по горизонтали» в течение жизненного цикла клетки. Стрелками указаны процессы репликации, транскрипции (прямой и обратной) и трансляции.

(транскрибирована) внутри клеточного ядра в комплементарную последовательность таких же пуриновых и пиримидиновых оснований вещества-посредника — информационной РНК. Эта РНК через поры ядерной мембраны переходит в цитоплазму, и записанная в ее структуре информация на уровне полирибосом переводится (транслируется) в некоторую последовательность аминокислот, образующих полипептид. Таким образом, генетическая информация с ДНК передается на РНК, а с РНК — на белки. Это и есть та самая теория кодирования информации, которая представляет собой наиболее важное достижение в биологии XX века (рис. 4).

Путь передачи информации ДНК → РНК → Белок можно было бы назвать «вертикальным» направлением (от ядра к цитоплазме) [5].

Наряду с этим интересно было бы также знать, как разворачивается проявление генетической информации «по горизонтали», т. е. с момента рождения клетки до последующего ее деления (рис. 5). Кроме того, важно было бы выяснить, что происходит, когда эти информационные потоки в клетке сталкиваются с вирусной инфекцией. Очевидно, что вирусная ДНК или РНК будет стремиться использовать клеточные механизмы для проявления своей собственной информации; но в какой момент и каким образом?

4. Клеточный цикл

Изучение клеточного цикла базировалось на представлениях цитокинетики, которые к 60-м годам, несмотря на их новизну, уже вполне сформировались.

Рассмотрим схему клеточного цикла, предложенную в 1953 г. Ховардом и Пелком [6]. Сразу после митоза каждая дочерняя клетка является диплоидной и имеет нормальный набор хромосом (рис. 6). Эта клетка должна пройти так называемую фазу G_1 , чтобы быть в состоянии удвоить свою ДНК в течение фазы S жизненного цикла. После удвоения ДНК клетка переходит в фазу G_2 и находится в тетраплоидном состоянии. В процессе митоза клетка снова делится, причем ее тетраплоидный набор хромосом распределяется поровну между двумя дочерними клетками; в результате этого каждая из новых клеток начинает цикл, имея диплоидный набор хромосом.

Установлено, что в нормальных тканях организма некоторые клетки, будучи дифференцированными, постоянно делятся. Таковы, например, клетки кишечного эпителия, костного мозга, эпидермиса, эпителия семенных канальцев («лабильные» клетки Биццоцери). Другие же клетки по окончании дифференцировки больше не пролиферируют («вечные» клетки Биццоцери). Лучшим примером клетки, не способной к делению, может служить нейрон, дифференцировка которого заканчивается сразу после рождения и который сохраняется на протяжении всей жизни индивидуума (условие, необходимое для сохранения следов памяти).

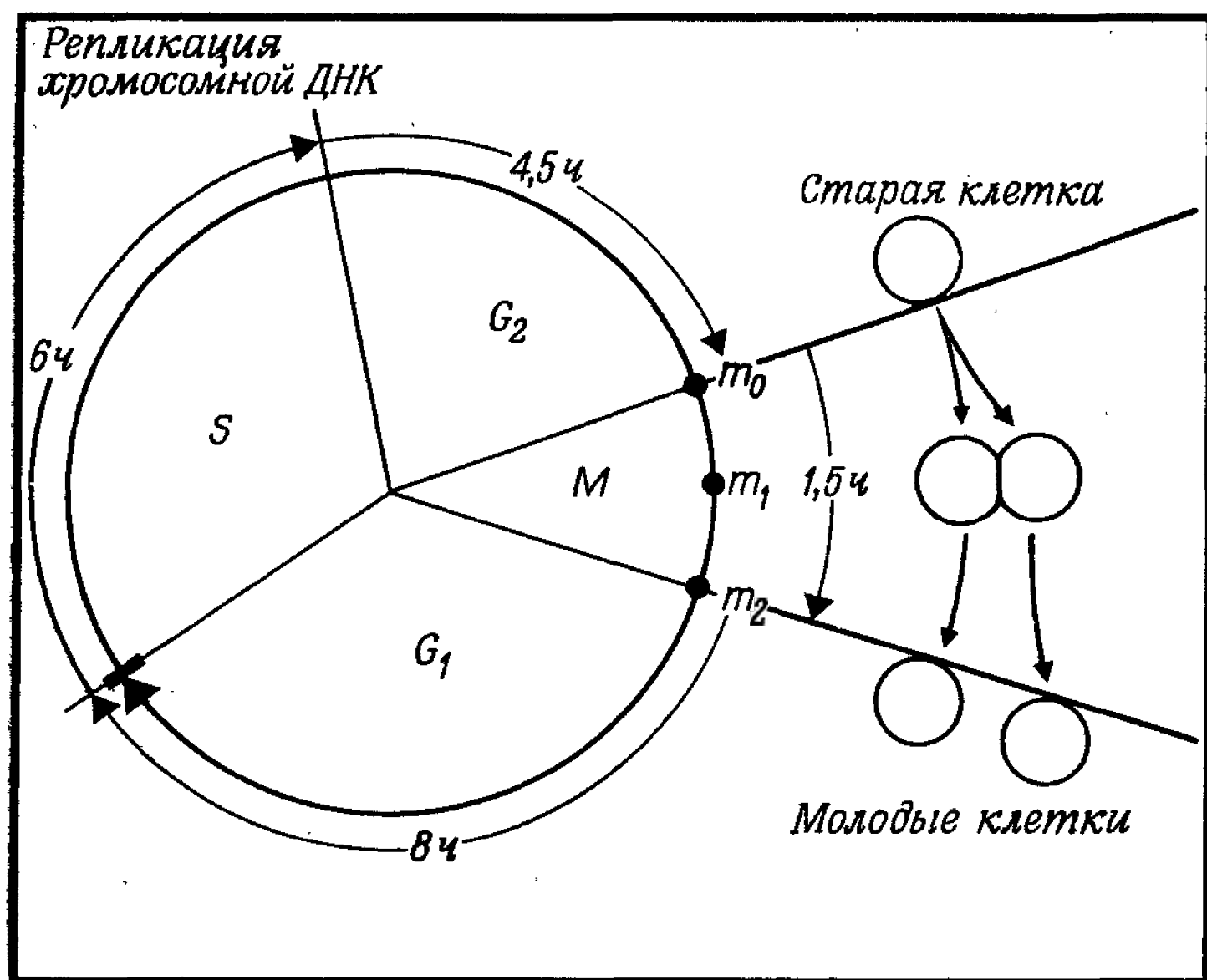


Рис. 6. Схема клеточного цикла и его фаз [30]. Дочерняя клетка сохраняет в течение всей фазы G_1 «старые», т. е. материнские, цепи ДНК. Дупликация этих цепей происходит в фазе S . В течение фазы G_2 в клетке находятся и «старые» цепи ДНК, и «новые» (синтезированные в фазе S). Во время фазы M (митоз — профаза, метафаза, анафаза и телофаза) материнская клетка передает каждой дочерней одну из старых цепей (имевшихся еще в фазе G_1) и одну из новых цепей (построенных в фазе S). Фаза G_1 у клеток разных типов имеет различную продолжительность (у некоторых клеток около 30 ч, а у некоторых может практически отсутствовать). Фазы S , G_2 и M более стабильны по продолжительности. В клетках HeLa длительность фазы M зависит от температуры. Для большинства клеток млекопитающих при росте *in vitro* продолжительность цикла составляет примерно 20 ч, при этом фазы G_1 , S , G_2 и M делятся соответственно 8, 6, 5 и 1 ч.

5. Опухолевая ткань

Рассмотрим с точки зрения теории клеточного цикла раковую опухоль.

Вначале многие авторы полагали, что раковая клетка утрачивает механизм «контактного торможения» и начи-

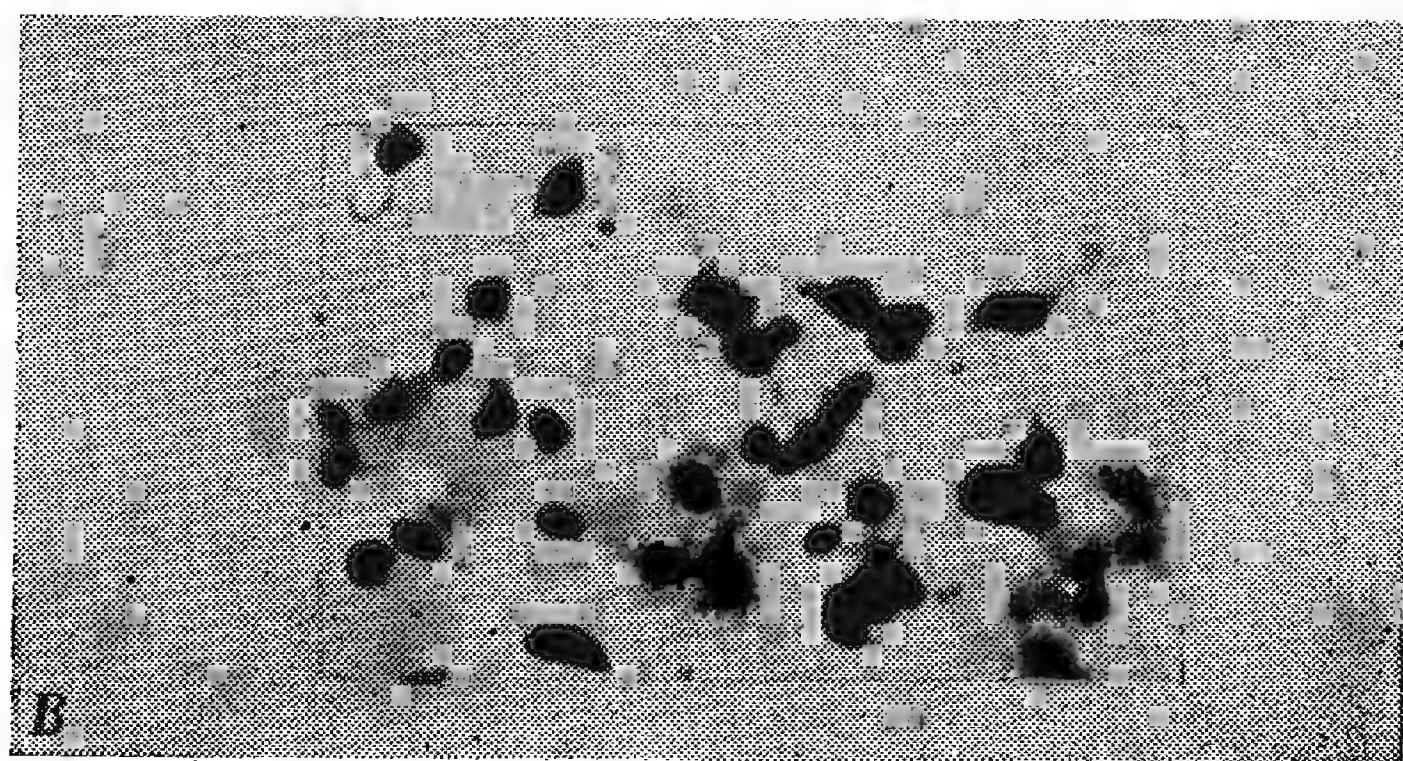
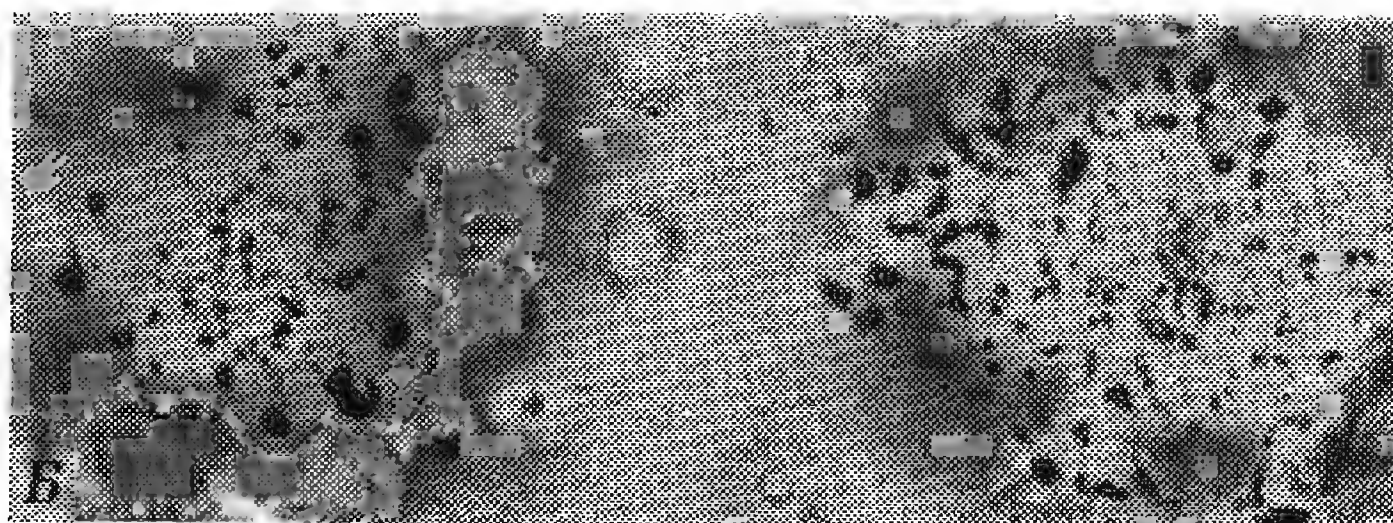
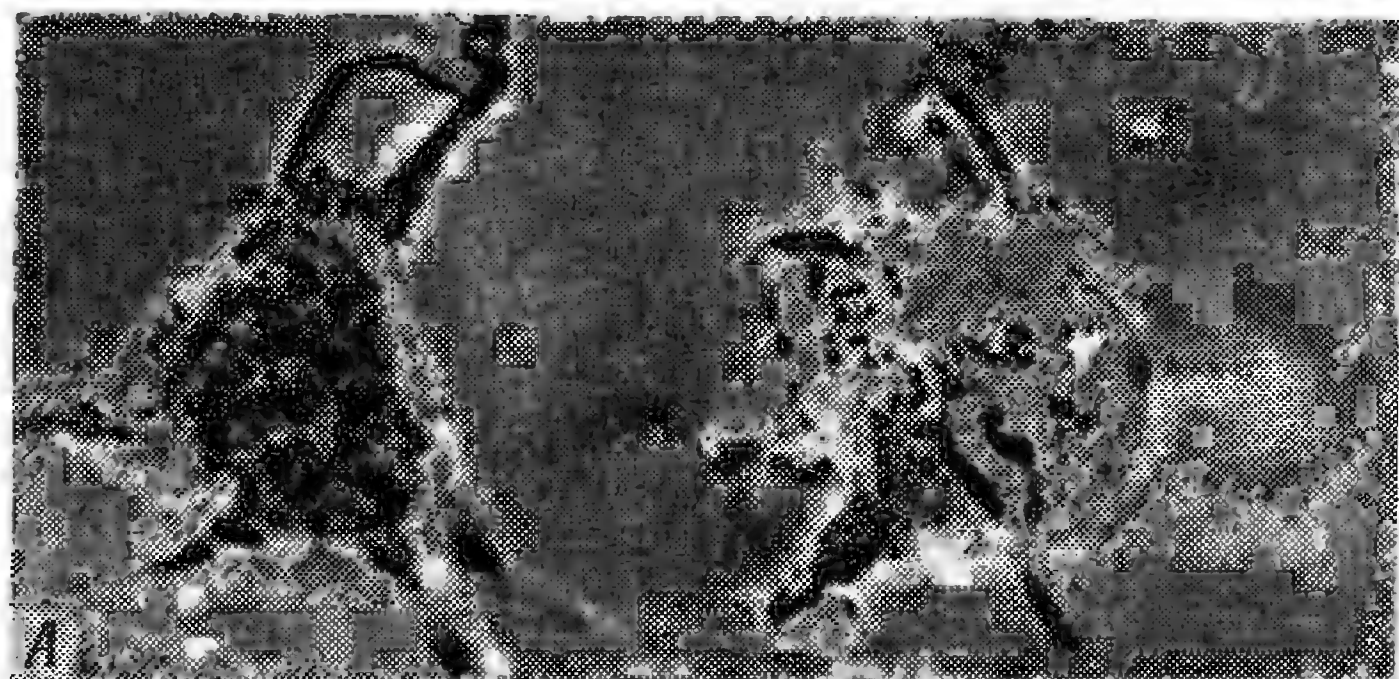


Рис. 7. Клетки и клеточные ядра, выделенные из мозга крысы [13].
А и Б. Нейроны в окружении глии, выделенные с помощью микро-
манипулятора по методу Хидена. В. Нейроны, изолированные в са-
харозном градиенте по методу Сатаке и Абе.

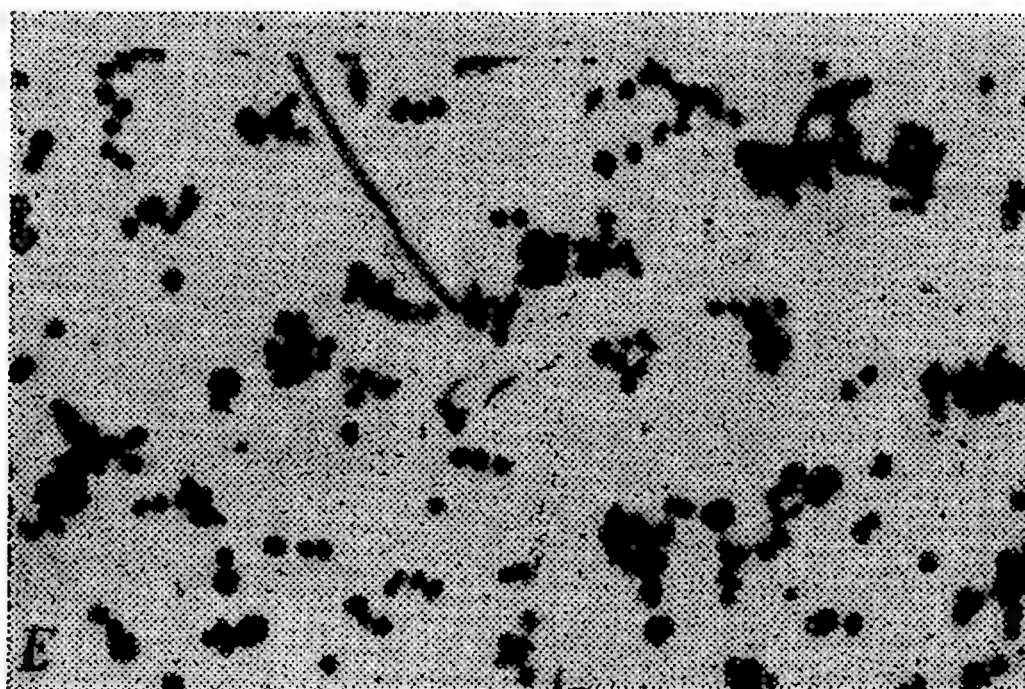
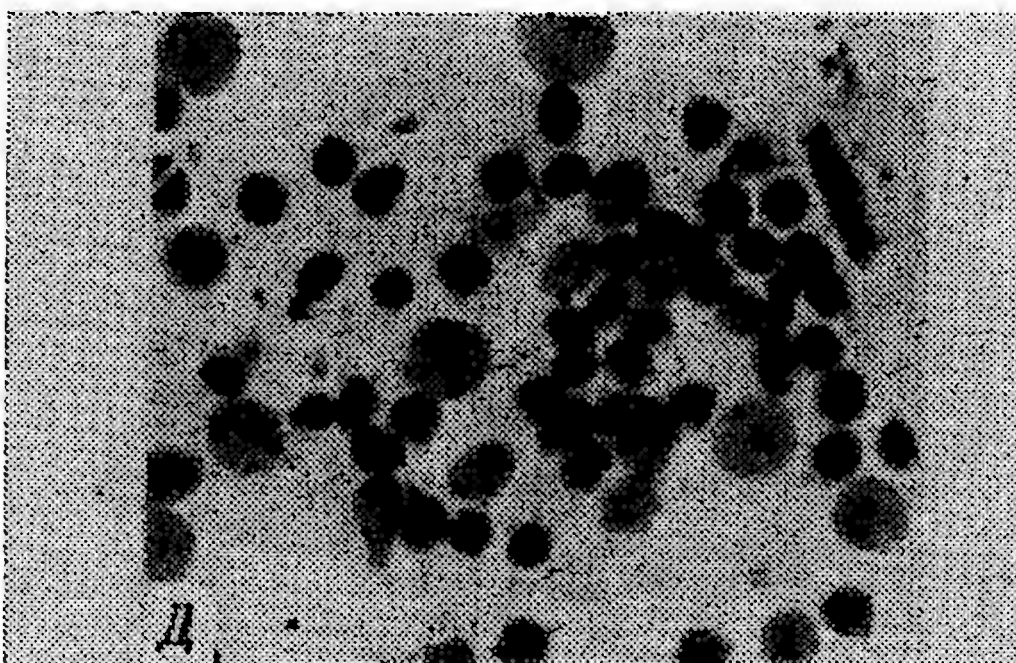
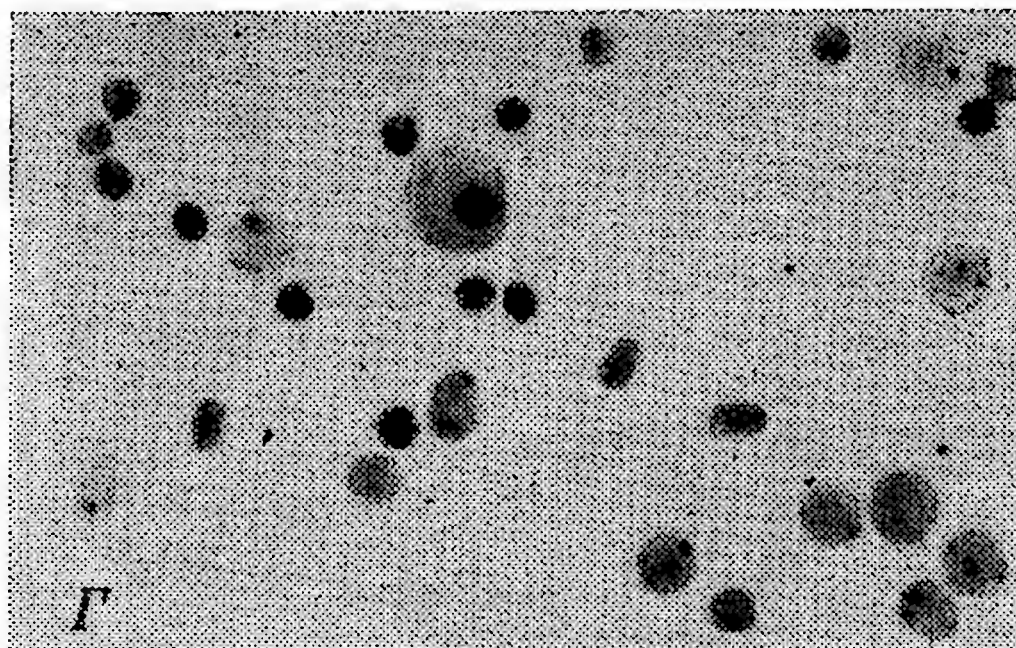
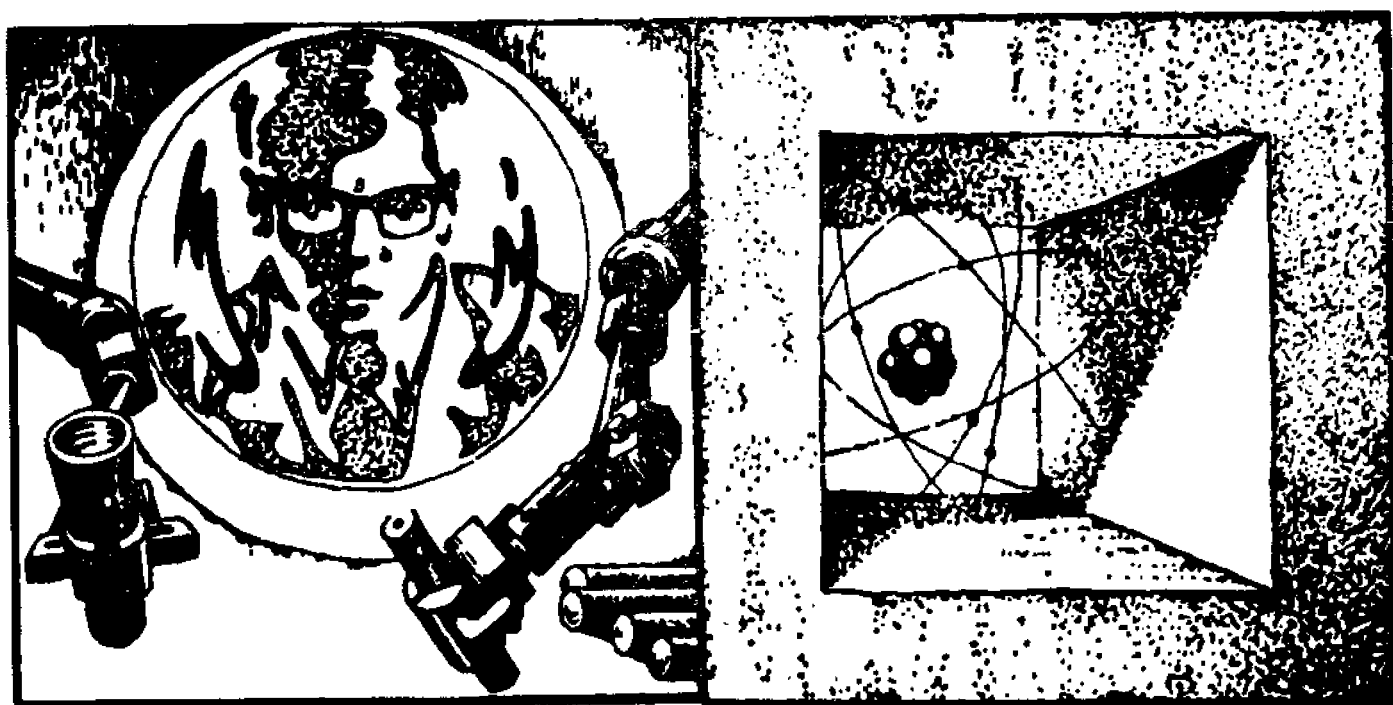


Рис. 7. Г и Д. Крупные ядра нейронов, изолированные в сахарозном градиенте по методу автора (1966). Е. Ядра глиальных клеток, полученные тем же методом.

нает ускоренно проходить митотический цикл. Такую клетку можно было бы назвать «взбесившейся». Позже, однако, было установлено, что цикл деления у раковых клеток замедлен по сравнению с нормальными клетками [7]. Из этого заключили, что рост раковой опухоли должен происходить главным образом в результате накопления клеток, которые не погибают [7]. Выдвигались и другие гипотезы.

В настоящее время существуют следующие представления. Как показано на рис. 7, раковая опухоль состоит в основном из трех клеточных популяций [8]. Есть клетки, которые больше не делятся вплоть до их гибели. Другие клетки как бы «заморожены» в так называемой фазе G_0 [9, 10] в ожидании момента, чтобы после некоторого стимула, например при уменьшении относительной доли пролиферирующих клеток, снова войти в митотический цикл. И наконец, имеются клетки, которые способны пролиферировать с различной длительностью клеточного цикла в зависимости от длины фазы G_1 (это одна из фаз, продолжительность которой может изменяться, в отличие от фазы S , в этом отношении необычайно постоянной).



6. Химиотерапевтический подход в лечении рака

Подразделение раковой ткани на различные клеточные популяции достаточно ясно показывает, насколько сложна проблема химиотерапии злокачественных опухолей. Вначале наибольшее внимание привлекали вещества, обладающие цитостатическим действием. Как известно, эти вещества блокируют или замедляют деление клеток, а иногда даже вызывают их гибель в определенный момент клеточного цикла [7, 8, 11]. Поскольку практически мы всегда имеем дело с гетерогенной системой, в которой делятся не все, а только некоторые клетки, цитостатическая химиотерапия рака связана с вполне понятными трудностями. Задачу усложняет также то, что химиотерапевтические агенты в какой-то степени влияют и на нормальные клетки. Для решения всех этих вопросов требуется более глубокое знание молекулярной биологии клетки, взаимосвязей между клетками и между клеткой и вирусом.

7. От нейрохимии к вирусологии

В 60-е годы началось интенсивное изучение механизмов контроля генной активности в глиальных клетках и нейронах, находящихся в фазе G_1 (рис. 8). В результате

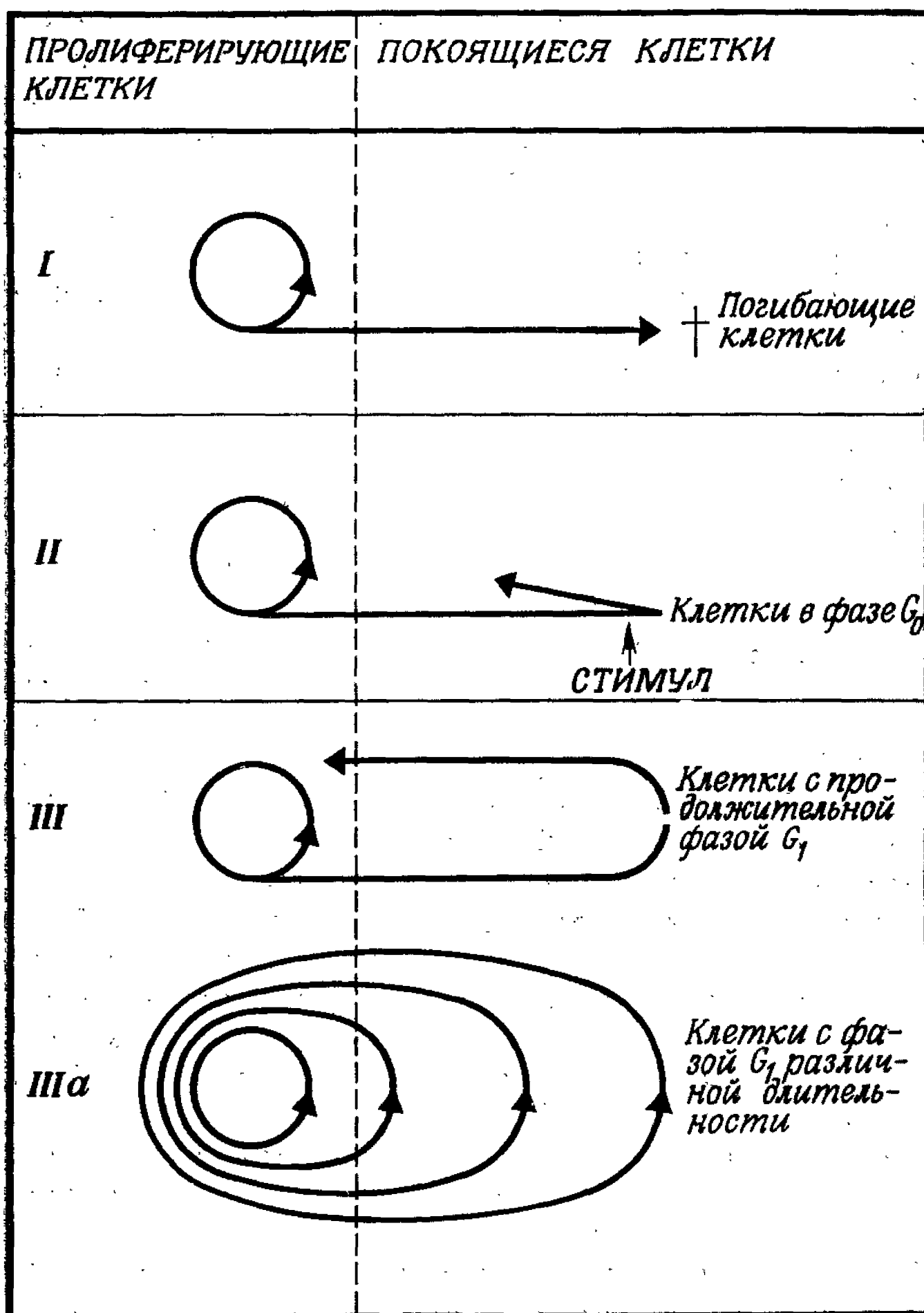


Рис. 8: Состав клеточной популяции в типичной опухоли [7, 8]. I — клетки, которые уже не вступают в митоз; II — клетки, длительно находящиеся в фазе покоя (G_0), но способные снова войти в цикл. III, IIIa — клетки с циклом разной продолжительности.

этих работ выяснилось, что в глии синтезируется мРНК с высоким молекулярным весом, которая переходит в ней-

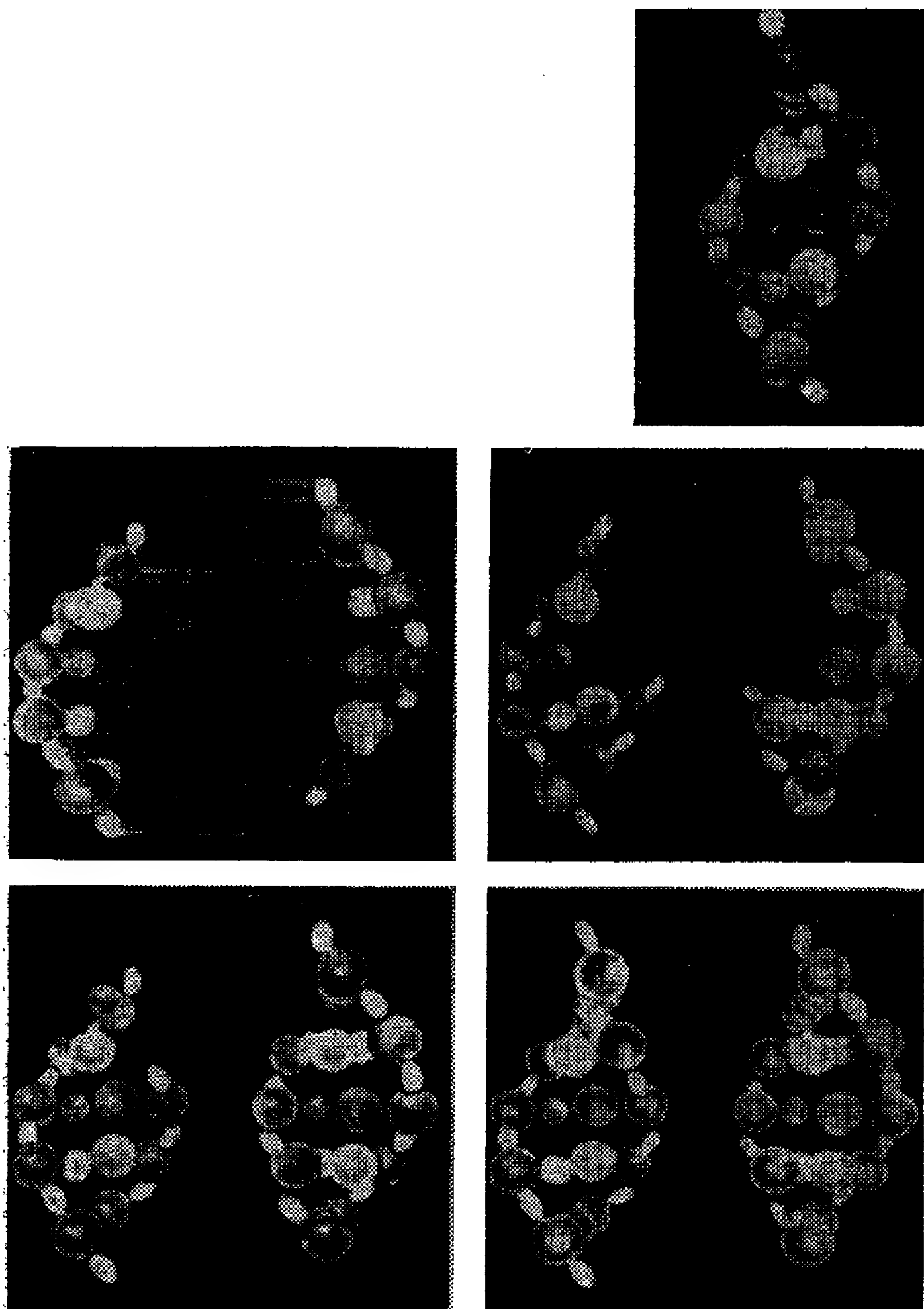
роны, остается там в течение примерно шести часов, а затем возвращается в глию, где расщепляется [12, 13]. Таким образом, впервые было экспериментально показано, что частица с мол. весом около 2 млн. может проходить через клеточную мембрану. Это подтверждало гипотезу Хидена о метаболическом обмене в системе нейрон — глия [14], а также давнюю идею анатомов прошлого века, согласно которой глия выполняет трофическую функцию по отношению к нейронам [15].

Нет сомнения в том, что мРНК глиальных клеток, переходя в нейрон, могла бы определять там синтез белков: дополнительно к тем, которые кодируются информационными РНК самого нейрона [12, 13]. Для чего же нужна эта помощь нейрону? Может быть, это связано с тем, что на нейрон, поскольку он больше не делится, возложена лишь одна функция — сохранять следы памяти?

Эти вопросы, естественно, требовали дальнейшего изучения взаимоотношений между клетками, раскрытия «языка» этих отношений и вызвали особый интерес в период 1965—1970 гг. [16]. Экспериментальные данные о переходе мРНК из глии в нейрон и обратно [12, 13] были подтверждены в ряде лабораторий [17—20], и сейчас этот переход считают установленным фактом [21—25].

Таким образом, в связи с проблемой временной организации контроля генной активности, и в частности макромолекулярных взаимодействий между вирусом и клеткой-хозяином, возникают два вопроса. Во-первых, нет ли аналогии между переходом мРНК из глии в нейрон и внедрением генома РНК-вируса в клетку? Во-вторых, проникает ли мРНК глии только в такую естественным образом «синхронизированную» клетку, какой является нейрон, находящийся в фазе G_1 ?

Кроме того, если вирус, входя в клетку-хозяина, блокирует синтез макромолекул, то не блокирует ли таким же образом глиальная мРНК макромолекулярные синтезы в нейронах? Если это так, то каковы здесь временные отношения [27]? В связи с этими вопросами возникла настоятельная необходимость дальнейшего изучения процессов *дупликации генов, транскрипции и трансляции* на протяжении клеточного цикла в культурах *in vitro* в отсутствие и в присутствии вирусной инфекции [1].



Биосинтез ДНК (Uрjohn, Genes in Action, 1966). После расплетания двойной спирали две «старые» цепи ДНК отходят друг от друга; каждая из них достраивает себе новую, комплементарную ей цепь. После окончания репликации каждая из старых цепей будет соединена с одной новой.

II. Репликация, репарация и модификация ДНК

8. Когда происходит репликация и когда — репарация ядерной ДНК?

Как известно, ДНК — важнейший макромолекулярный компонент клетки — находится в клеточном ядре (см. рис. 3).

В фазе S клеточного цикла хромосомная ДНК должна предварительно деспирализироваться, чтобы стала возможной ее дупликация (рис. 9). Но только ли в этой фазе синтезируется ДНК? В действительности для молекул ДНК предполагается два биосинтетических процесса. Первый из них — это репликативный синтез, обеспечивающий удвоение хромосом [28], а второй — репаративный синтез, необходимый для исправления нарушенных участков хромосом [29].

Почему наряду с репликативным синтезом бывает нужен и репаративный синтез ДНК? Как известно, репликация ДНК осуществляется *полуконсервативным* способом [28]; при этом генетическая информация непрерывно передается от одного поколения другому. Понятно, что при передаче цепей ДНК дочерним клеткам в течение многих лет, веков и даже тысячелетий в структуре этих цепей могут возникать «ошибки». В связи с этим в процессе эволюции живой материи выработался механизм, способный исправлять участки ДНК, в которых появились такого рода искажения.

Если репликативный синтез как нормальный процесс, видимо, происходит в период деспирализации ДНК в фазе S, то репаративный синтез мог бы происходить и тогда, когда ДНК не полностью развернута (т. е. в другие фазы клеточного цикла).

Как видно из рис. 10, в синхронизированных клетках HeLa репликативный синтез ДНК протекает в течение фазы S клеточного цикла по сигмоидальной кривой, тогда как репаративный синтез ДНК происходит на протя-

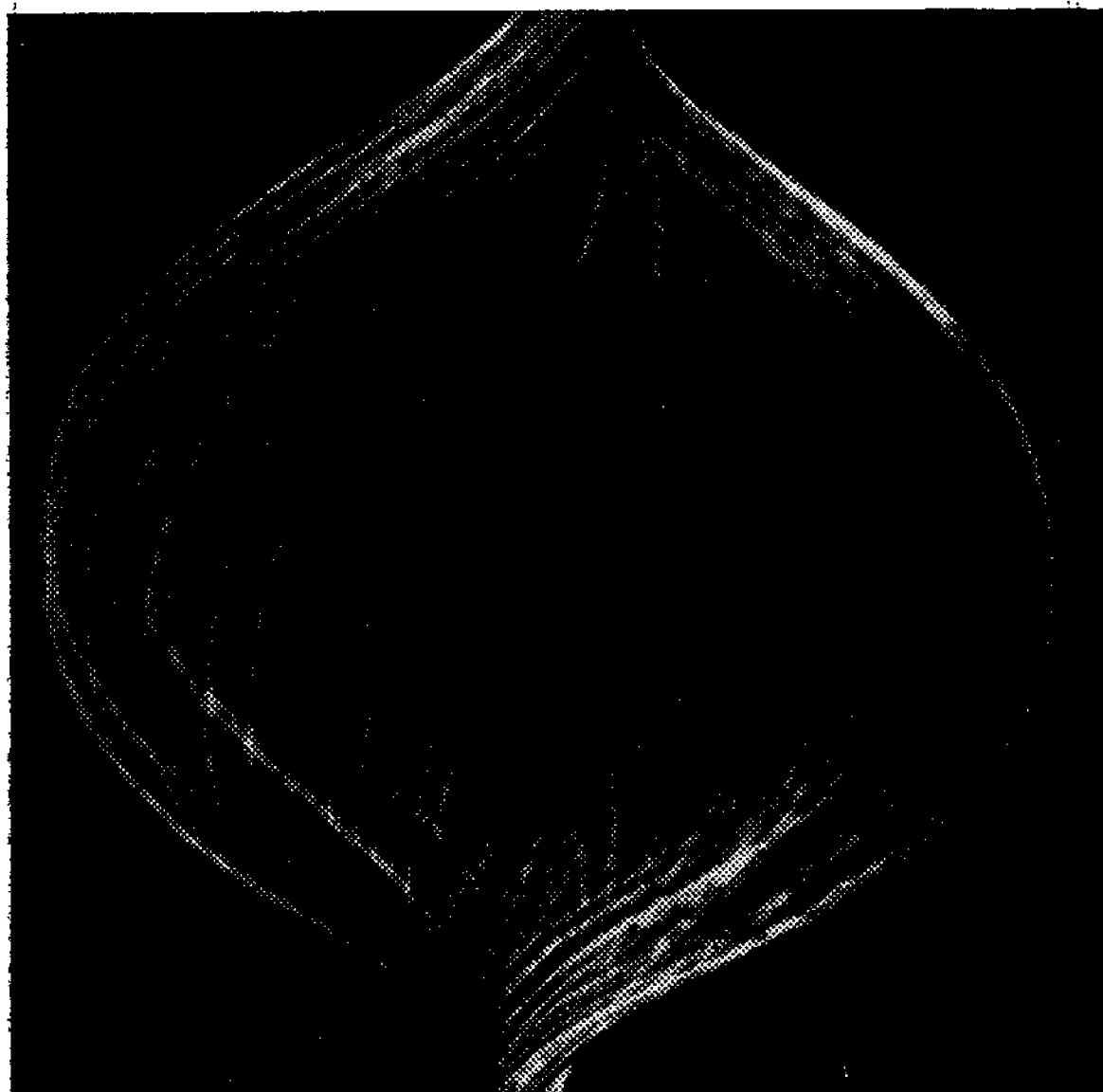
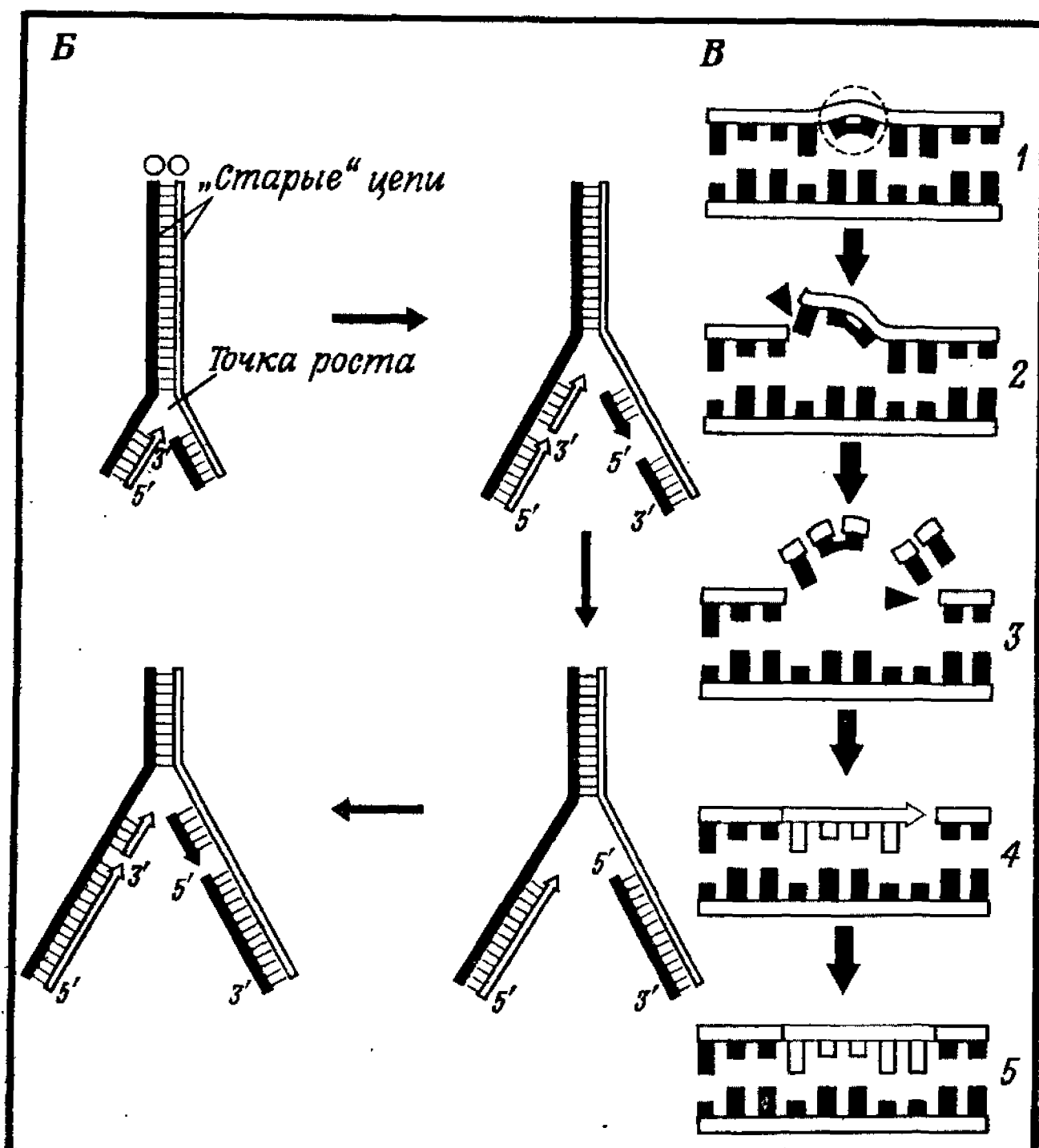
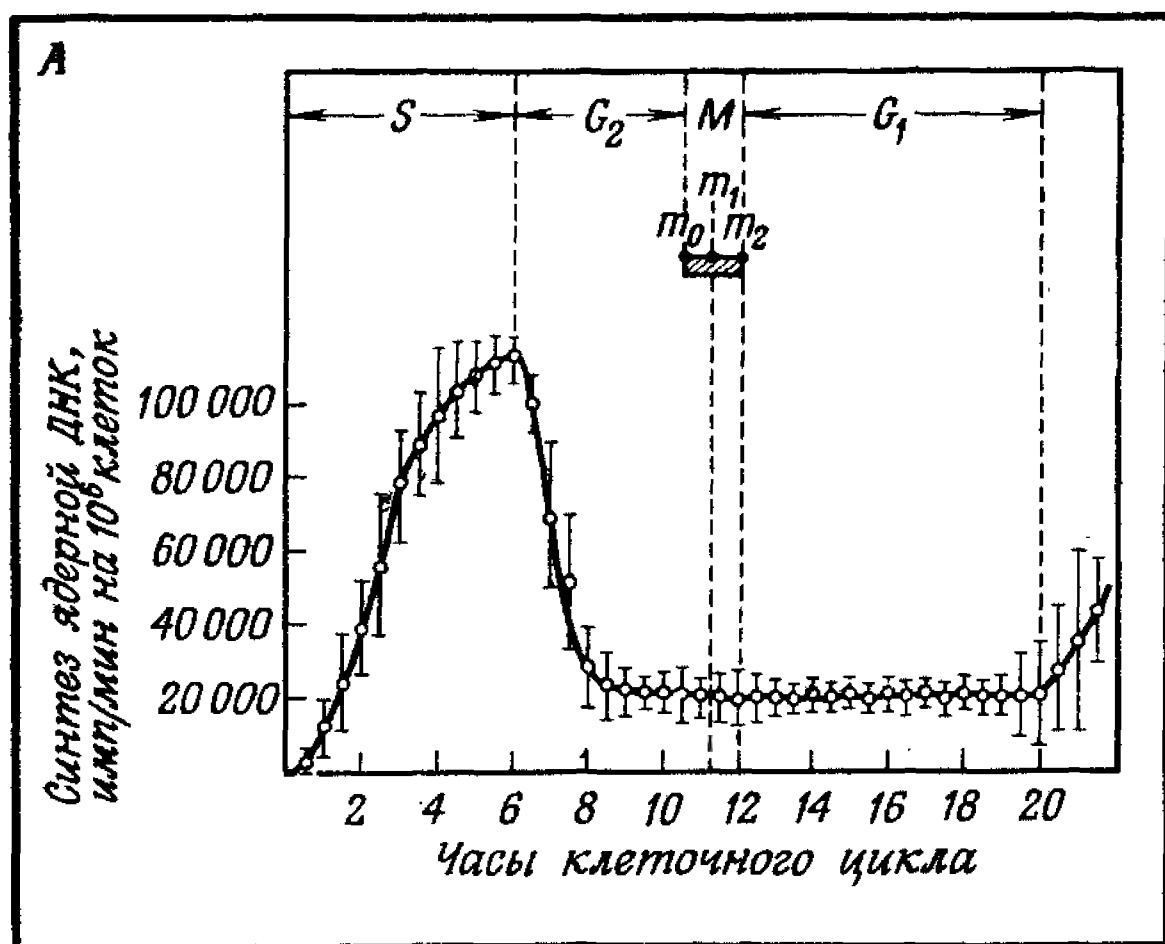


Рис. 9. Деспирализация ДНК перед ее удвоением (Uprjohn, Genes in action, 1966). Схема иллюстрирует разворачивание хромосомной ДНК, которая в фазе клеточного цикла перед репликацией деспирализуется.

жении всей остальной интерфазы с некоторой постоянной интенсивностью [30]. Вне фазы S в хромосомную ДНК включается примерно в 10 раз меньше радиоактивного тимидина, чем в течение фазы S.

Следовательно, в жизненном цикле эукариотической клетки имеет место четкое программирование функций: в то время как в фазе S происходит репликативный синтез ДНК в местах ее полной деспирализации (при участии ДНК-зависимой ДНК-полимеразы [31] и ДНК-лигазы [32, 33]), в остальных фазах клеточного цикла в случае частичной декомпактизации ДНК может происходить ее репарация. Вне фазы S, вероятно, в основном действует механизм, который при участии репаративных ферментов исправляет те участки генома, где по какой-либо причине возникли искажения [29]. Можно предположить,



что при отсутствии таких ферментов любые мутации могли бы приводить клетку к гибели или изменять ее дальнейшее развитие.

9. Два митохондриальных цикла в одном клеточном цикле!

В клетке ДНК имеется не только в хромосомах, но и в митохондриях.

Для полного представления обо всем синтезе ДНК необходимо также учесть и процесс репликации митохондриальной ДНК на протяжении клеточного цикла и сравнить его с синтезом, происходящим в ядре [34].

Как видно из рис. 11, в то время как синтез хромосомной ДНК в ядре происходит в фазе S (см. также рис. 10), митохондриальная ДНК синтезируется на двух различных этапах клеточного цикла: в первый раз в той же фазе S одновременно с ядерной ДНК, а второй раз — в фазе G₂, когда синтез ядерной ДНК уже закончен и, как показывает рис. 10, идет только репаративный синтез [35].

Когда это выяснилось, прежде всего возникла мысль, что в клетке могут существовать два класса генетически различных митохондрий, каждый со своей особой ДНК и своим временем репликации. При изучении физико-химических свойств митохондриальной ДНК, выделенной в

Рис. 10. Отношения между репликативным и репаративным синтезом ядерной ДНК на протяжении митотического цикла клеток HeLa. А. В фазе S ДНК реплицируется, в остальной части интеркинеза происходит ее репарация (или ее амплификация). Эти процессы прослежены по включению ³H-тимидина в ядерную ДНК в течение 30-минутных периодов [30]. Б. Схема репликации двух цепей ДНК с образованием фрагментов Оказаки, растущих в направлении 5'→3' [33]. В. Схема репарации ДНК в участке, поврежденном, например, в результате облучения ультрафиолетом. 1 — индукция димера Т—Т; 2 — разрыв цепи с одной стороны димера под действием специфической эндонуклеазы; 3 — элиминация участка, содержащего димер, с помощью экзонуклеазы; 4 — новообразование этого участка в направлении 5'→3' с помощью ДНК-полимеразы; 5 — сшивка с восстановлением пар оснований при участии ДНК-лигазы [4].

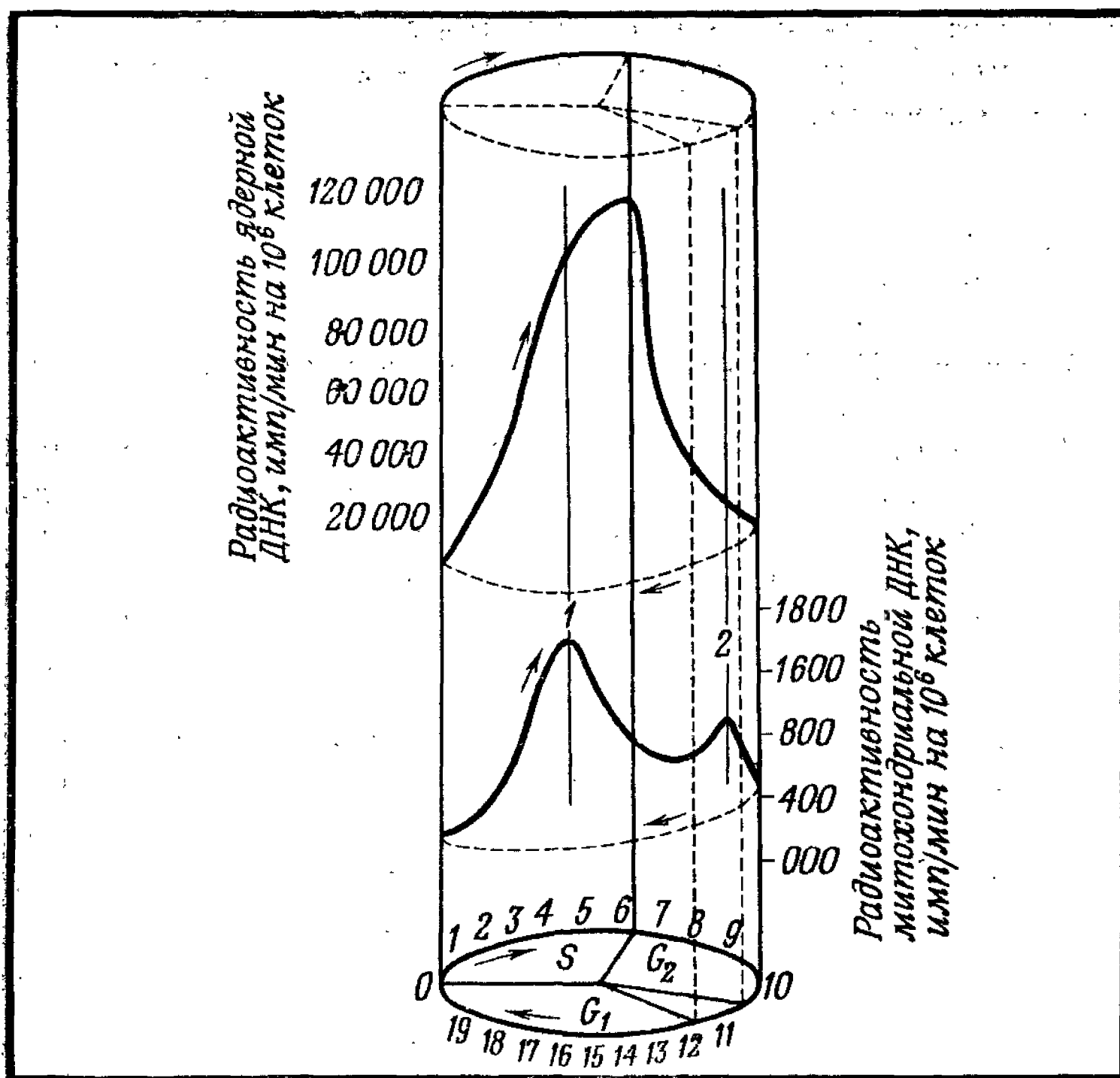
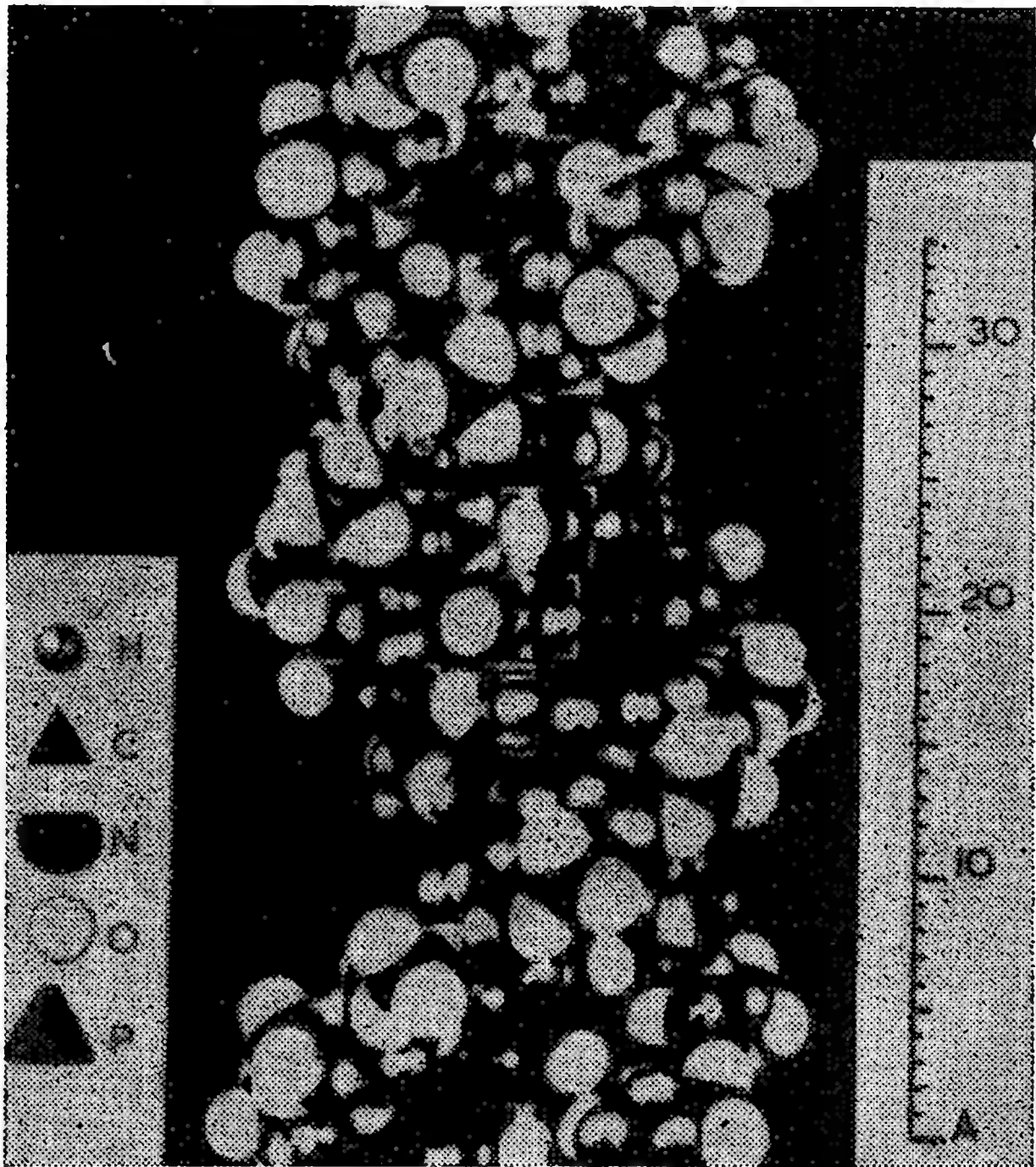


Рис. 11. Сравнение времени синтеза ядерной и митохондриальной ДНК в течение митотического цикла клеток HeLa [34]. Биосинтез прослеживали по включению ^3H -тимидина в течение 30-минутных периодов.

фазе S и в фазе G_2 , было установлено, что действительно существуют различия между этими двумя препаратами [34, 35]. Таким образом, гипотезу о том, что в эукариотической клетке существуют разные типы митохондриальной ДНК и, следовательно, генетически различные митохондрии, можно считать правдоподобной.

В связи с этим возникают новые интересные вопросы: может ли какой-либо класс митохондрий при репликации своей ДНК находиться под влиянием того же механизма, который регулирует репликацию хромосомной ДНК? А с

другой стороны — может ли репликация митохондриальной РНК быть независимой от такого механизма, независимой от факторов, регулирующих репликацию ДНК в ядрах? Нельзя ли, например, представить себе, что существуют два жизненных цикла митохондрий, один из которых синхронизирован с дупликацией ядерной ДНК, а другой сдвинут относительно жизненного цикла клетки?



10. Модифицируется ли ДНК?

Известно, что молекула ДНК не только удваивается и репарируется, но может также подвергаться модификации [36—38]. Необходимость репарации могла бы быть, в частности, связана и с физиологической модификацией ДНК [1, 39].

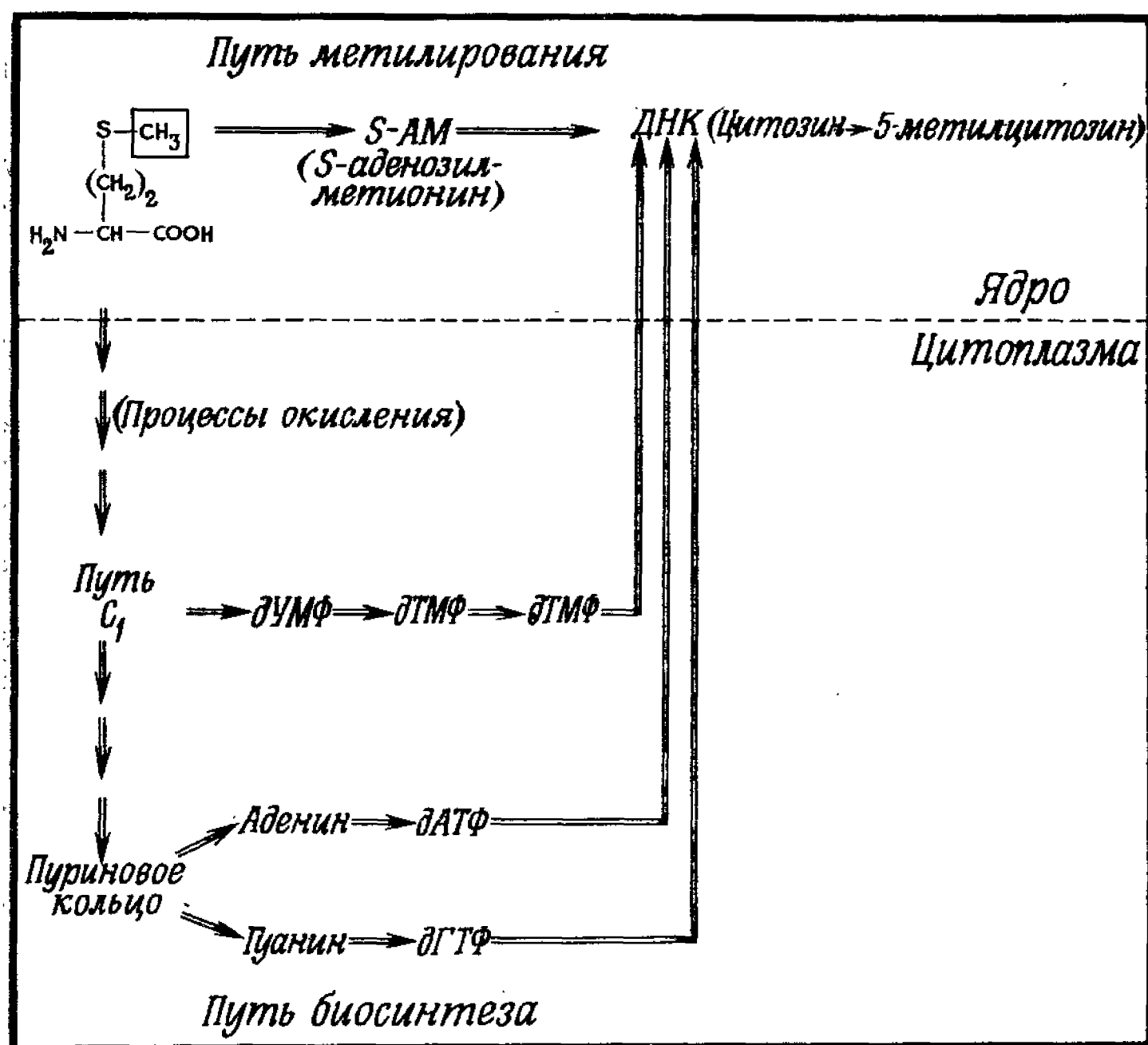


Рис. 12. Схема одновременных процессов синтеза и метилирования ядерной ДНК по данным экспериментов с использованием (^{14}C -метил)-метионина на целых клетках [39]. Группа $^{14}\text{CH}_3$ метионина целиком переносится на цитозины ДНК-полимера (путь метилирования); наряду с этим меченый атом ^{14}C метильной группы метионина включается в аденин, гуанин и тимин, которые служат предшественниками ДНК (биосинтетический путь). В изолированных ядрах биосинтетический путь не осуществляется из-за отсутствия пула нуклеозидтрифосфатов.

Под модификацией подразумеваются какие-либо изменения в последовательностях пуриновых и пиримидиновых оснований, например замена одного основания другим.

Для модификации ДНК существуют особые ферменты [40, 41]. К наиболее важным из них относится ДНК-метилаза [42, 43]. Этот фермент переносит метильную груп-

пу от донора (S-аденозилметионина) на один из цитозинов, находящихся в ДНК-полимере [44]. В результате цитозин ДНК превращается в 5-метилцитозин. Этот процесс очень важен, так как ясно, что любая небольшая модификация в молекуле ДНК — носителя генетической информации — может иметь исключительное значение не только для индивида, но и для вида в целом. Ниже этот вопрос будет рассмотрен более подробно.

11. Когда и какие цепи ДНК метилируются!

Первый вопрос, который был подвергнут исследованию, заключается в следующем: в каких временных отношениях находятся синтез и метилирование ДНК?

Уже давно подготавливался эксперимент, который мог бы дать ясный ответ на этот вопрос. Он был основан на идее использования одного меченого предшественника, позволяющего сразу получить сведения как о репликации ДНК, так и о ее метилировании [45].

На рис. 12 представлена схема опыта [39].

Метионин имеет метильную группу и после превращения в S-аденозилметионин способен метилировать ДНК [46]. Этот процесс происходит в ядре. Кроме того, углерод метильной группы после ряда окислительных реакций может войти в пуриновое кольцо и таким образом включиться в основной скелет молекулы аденина или гуанина; аденин и гуанин в свою очередь превращаются в нуклеозиды, а затем в их ди- и трифосфаты (дАТФ и дЦТФ); эти нуклеозидтрифосфаты служат предшественниками в синтезе ДНК.

Углерод метильной группы метионина не может, однако, войти в пиримидиновое кольцо, так что в цитозин он не включается. Тем не менее эта группа может соединяться с пиримидиновым кольцом урацила. В этом случае в растворимом пуле урацил превращается в тимин, присоединяя группу — CH_3 в положении 5. Эта CH_3 -группа содержит углерод, происходящий из метильной группы метионина. Образовавшийся тимин превращается в нуклеозидтрифосфат дТТФ, который в свою очередь

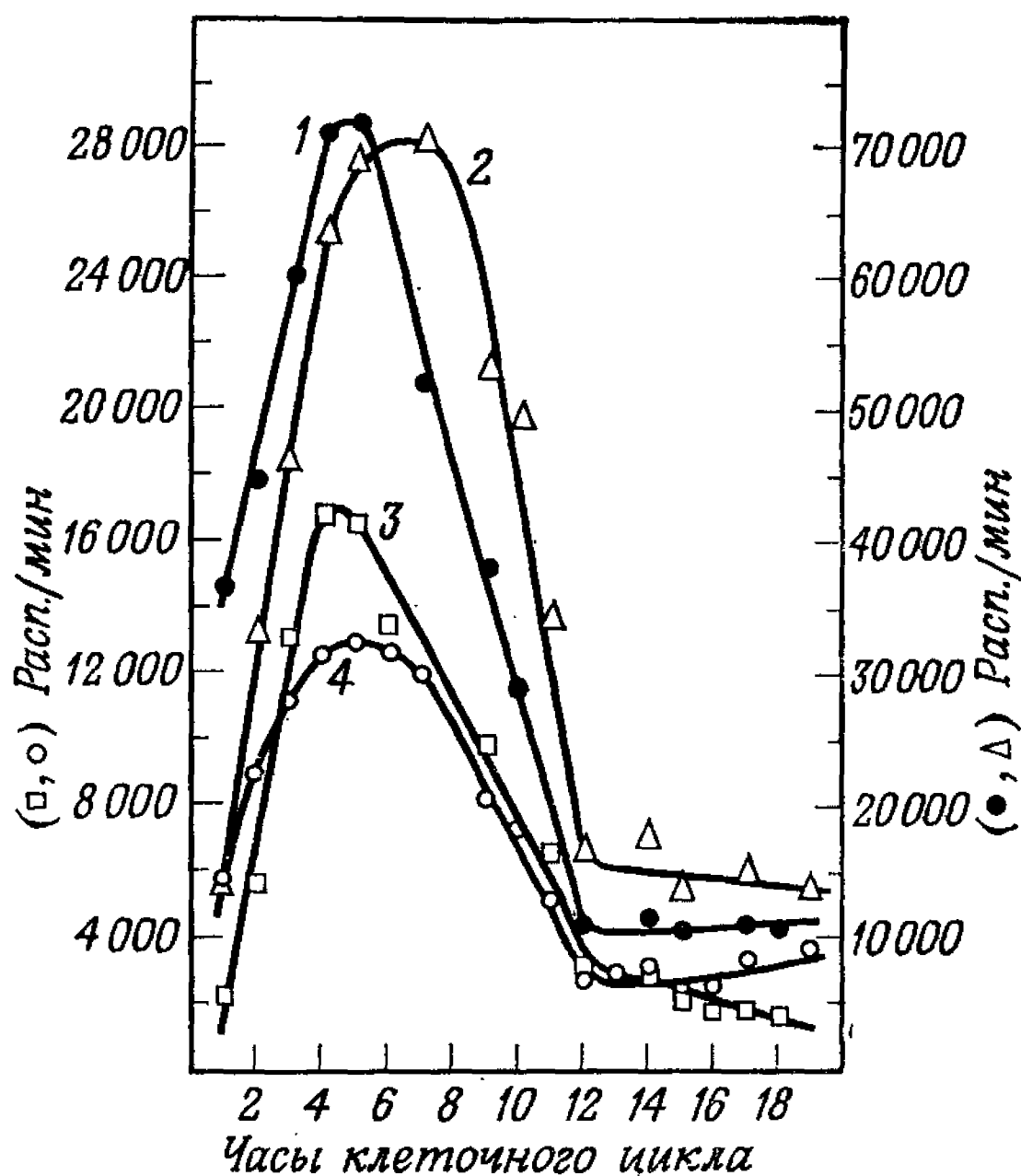


Рис. 13. Корреляция между синтезом и метилированием ядерной ДНК в течение митотического цикла клеток HeLa [47]. Оба процесса прослежены по данным об удельной радиоактивности оснований в гидролизате ДНК из клеток, инкубированных с (^{14}C -метил)-метионином (при 60-минутных периодах включения метки с часовыми интервалами на протяжении всего цикла). 1 — аденин; 2 — тимин; 3 — гуанин; 4 — 5-метилцитозин.

участвует вместе с дАТФ и дЦТФ в синтезе ДНК. Эти процессы происходят в цитоплазме.

Исходя из этого, предположили, что, используя общий меченый предшественник — (^{14}C -метил)-метионин, — можно параллельно или раздельно (проводя опыты на целых клетках или на изолированных ядрах) проследить метилирование ДНК (при участии ДНК-метилазы) и синтез ДНК (при участии ДНК-зависимой ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы) [45].

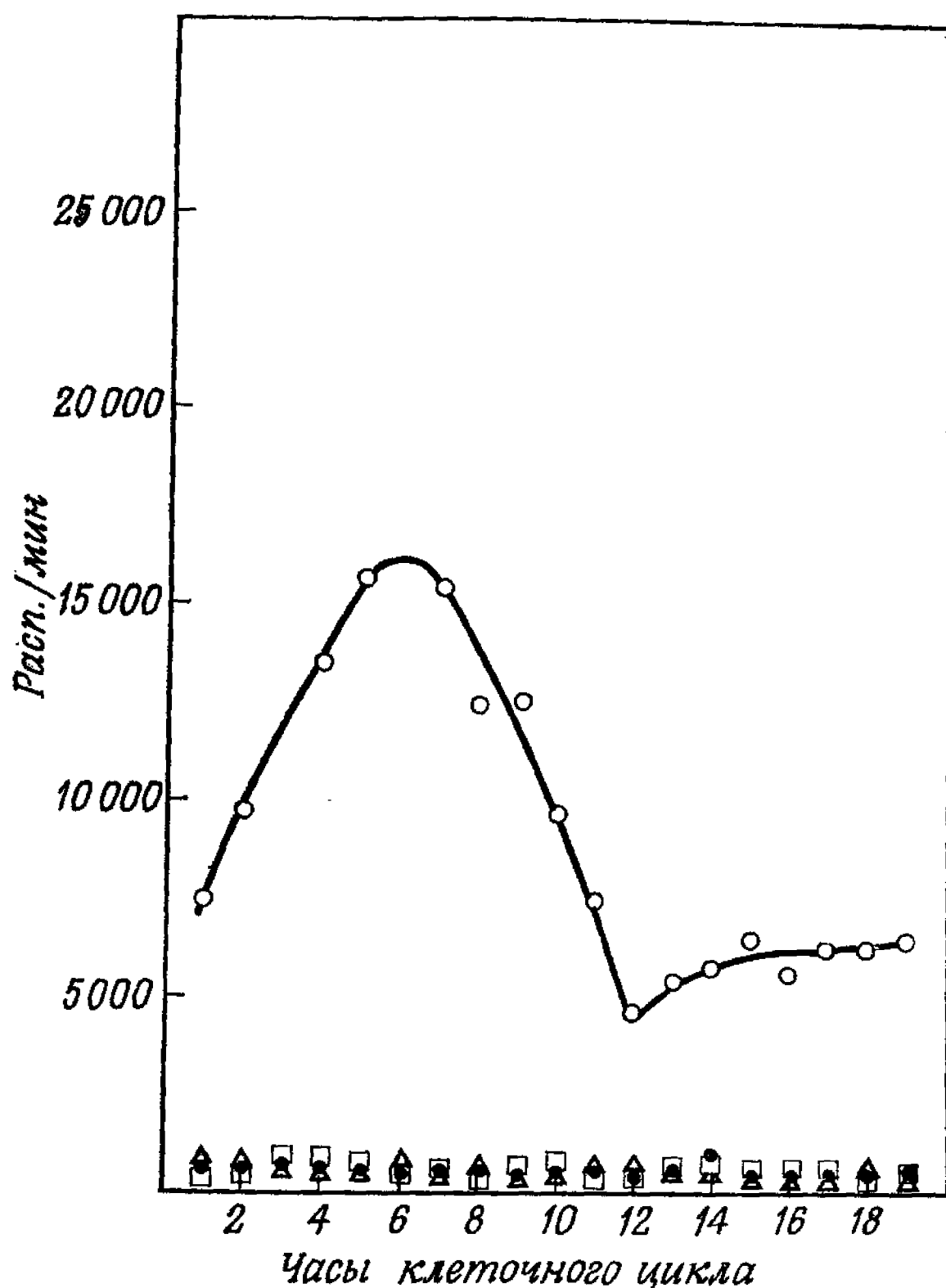


Рис. 14. Метилирование ДНК в изолированных ядрах [47]. О процессе судили по удельной радиоактивности 5-метилцитозина в гидролизате ДНК, выделенной из изолированных ядер после инкубации их с (^{14}C -метил)-метионином или с S-аденозил-(^{14}C -метил)-метионином (при 60-минутных периодах включения с часовыми интервалами на протяжении всего цикла). Светлые кружки — 5-метилцитозин; черные кружки — аденин; квадратики — гуанин; треугольники — тимин.

Были проведены две серии экспериментов (рис. 13 и 14).

В первой серии целые клетки метили (^{14}C -метил)-метионином в течение 30 мин с интервалами 1 ч. После каждого 30-минутного периода из клеток экстрагировали

ДНК, очищали ее, гидролизовали до оснований и проводили хроматографию [47]. В элюированных с бумаги пятнах определяли радиоактивность, соответствующую ^{14}C -метионину. Аденин, гуанин, тимин и 5-метилцитозин обнаруживали большую радиоактивность в фазе S клеточного цикла. Цитозин не метился. Метилирование ДНК, прослеженное по метке 5-метилцитозина, проходило параллельно с синтезом ДНК, о котором судили по включению метки в аденин, гуанин и тимин (рис. 13). Метка в этих трех основаниях в сопоставлении с меткой в 5-метилцитозине служила, таким образом, надежным «внутренним» контролем при установлении корреляции между синтезом и метилированием ДНК.

Во второй серии опытов с (^{14}C -метил)-метионином (или, лучше, с радиоактивным S-аденозилметионином) инкубировали не целые клетки, а только изолированные ядра, в которых, как известно, синтез ДНК не происходит из-за отсутствия пула нуклеозидтрифосфатов [48]. В этих условиях путь синтеза ДНК был «хирургически» исключен [47]. В изолированных ядрах метилирование ДНК, прослеженное по включению метки в 5-метилцитозин, оставалось в фазе S таким же, как и в первой серии опытов, а радиоактивность аденина, гуанина и тимина, которая указывала бы на синтез ДНК, полностью отсутствовала (рис. 14). Таким образом, метилирование ДНК в фазе S клеточного цикла всегда происходило и в отсутствие синтеза ДНК.

Эти результаты весьма существенны. Стало ясно, что в изолированных ядрах, где не могут работать ДНК-полимераза и ДНК-лигаза, синтезирующие новую ДНК, ДНК-метилаза продолжает действовать, образуя 5-метилцитозин в ДНК-полимере [47].

Кроме того, из этих экспериментов следовал неожиданный и важный вывод: если в изолированных ядрах не могут синтезироваться новые цепи ДНК, то, значит, метилирование, наблюдаемое в фазе S (рис. 14), происходит только в старых цепях ДНК, т. е. в тех, которые дочерные клетки унаследовали от материнской клетки. Эти результаты, подтвержденные другими исследованиями [49], явились важным этапом в изучении метилирования ДНК в изолированных ядрах [39].

12. Метилирование ДНК — процесс неравномерный и дифференцированный

После того как было установлено, что «старые» цепи ДНК метилируются в фазе S клеточного цикла, возник вопрос, равномерно или неравномерно происходит такое метилирование [39].

К этому вопросу привели следующие соображения. По расчетам, в ядре эукариотической клетки, например клетки HeLa (см. рис. 1 и 2), содержится ДНК с общим молекулярным весом около 5000 млрд. Это примерно соответствует количеству ДНК в 5000 бактериальных клетках. Хромосомы клеток, в которых размещена вся эта ДНК, имеют сложнейшую организацию [50]. Кажется маловероятным, чтобы образующиеся 5-метилцитозины распределялись по всей длине цепей ДНК равномерно, без каких-либо вариаций по отдельным генам. Для того чтобы проверить это, нужны были тщательные исследования [39]. Вначале была сделана попытка фракционировать ДНК.

На рис. 15 представлены проведенные эксперименты по фракционированию ДНК из клеток HeLa в градиенте сульфата цезия с серебром [51]. В таком градиенте получили две фракции: одну небольшую, но более тяжелую, богатую гуанином и цитозином, и другую — большую и более легкую, богатую аденином и тиминном. Обе фракции оказались метилированными. Пунктирная кривая на рис. 15 соответствует распределению 5-метилцитозинов в этих двух фракциях. Каждую из фракций ДНК гибридизировали с рибосомальной РНК, и оказалось, что эта РНК комплементарна более тяжелой фракции (этого и ожидали, исходя из более высокого содержания в ней Г и Ц). Таким образом, была выделена фракция ДНК, обогащенная генами рибосомальной РНК [52]. Эти данные были подтверждены в других лабораториях [53, 54].

Возвращаясь к распределению 5-метилцитозина в фракциях ДНК (рис. 15), отметим, что повышенный уровень метилирования в пике с большим содержанием гуанина и цитозина (с учетом статистического разброса) не вызывает удивления: понятно, что, чем больше в цепи

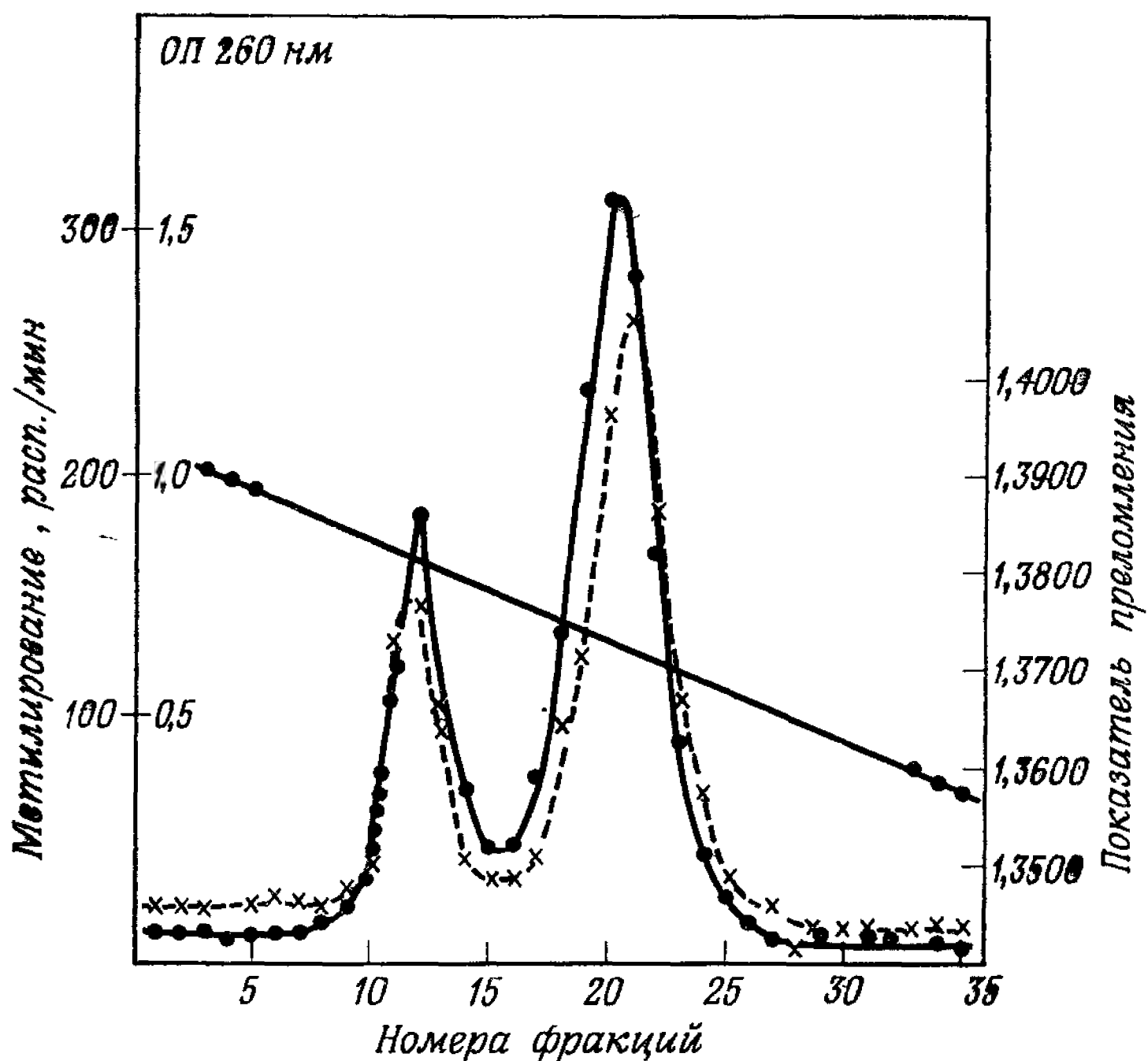


Рис. 15. Дифференциальное метилирование двух классов ядерной ДНК в клетках HeLa [51]. В градиенте $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{—Ag}^+$ получали два пика ДНК: более «тяжелый», с сильно метилированным левым плечом, и более «легкий», с сильно метилированным правым плечом. Сплошной линией показана оптическая плотность (ОП) ДНК, пунктирной линией — радиоактивность ДНК, соответствующая распределению 5-метилцитозина.

ДНК цитозина, тем больше вероятность ее метилирования.

Неожиданным оказалось другое — достаточно высокий уровень метилирования цепей ДНК, богатых аденином и тиминном, в менее плотной фракции. Значит, в этой фракции относительный уровень метилирования не мог объясняться величиной «мишени». Действительно, в то время как мишень по мере обогащения нитей ДНК парами АТ уменьшалась, метилирование увеличивалось.

Это явно указывает на то, что в данном случае метилирование некоторых участков цепи, возможно, не объясняется просто распределением пар ГЦ [52]. С другой стороны, можно было предположить, что существуют два субстрата для метилирования — обогащенный ГЦ (возможно, типа ...ГЦГ...) и обогащенный АТ (возможно, типа ...ГЦА...) — и что должны существовать также два разных типа ДНК-метиляз [1, 52].

13. Не происходит ли избирательного метилирования повторяющихся последовательностей регуляторных генов?

На рис. 16 представлены результаты опытов, показывающих, что в ДНК более интенсивно метилируются повторяющиеся последовательности транскриптона (транскрипционной единицы), т. е. гены-регуляторы [39].

ДНК, сильно метилированную в середине фазы S клеточного цикла (см. рис. 13 и 14), подвергали очистке в градиенте CsCl [35]. После соответствующей обработки [39] эту ДНК гибридизировали с гигантской РНК, выделенной из ядер (пре-мРНК) [55].

Полученные гибриды содержали 5-метилцитозин (рис. 16, Б). Но когда ту же метилированную ДНК гибридизировали с мРНК, выделенной из полисом (мРНК короче пре-мРНК, являющейся ее предшественником [55, 56]), в гибридах уже не было 5-метилцитозина (рис. 16, В). Эти результаты ясно показали, что метилирование, видимо, происходит главным образом в регуляторных генах (в регуляторной зоне транскриптона [55]), но не в структурных генах (в уникальной зоне транскриптона [55]).

Этот вывод был еще одним шагом вперед в изучении метилирования ДНК [39]. Как мы увидим, это имело решающее значение не только для понимания структурной модификации ДНК как таковой, но и для поисков места специфического взаимодействия между геномом онкогенного вируса и геномом клетки [39].

Подводя итоги, можно сказать следующее: ядерная ДНК реплицируется в фазе S и репарируется в осталь-

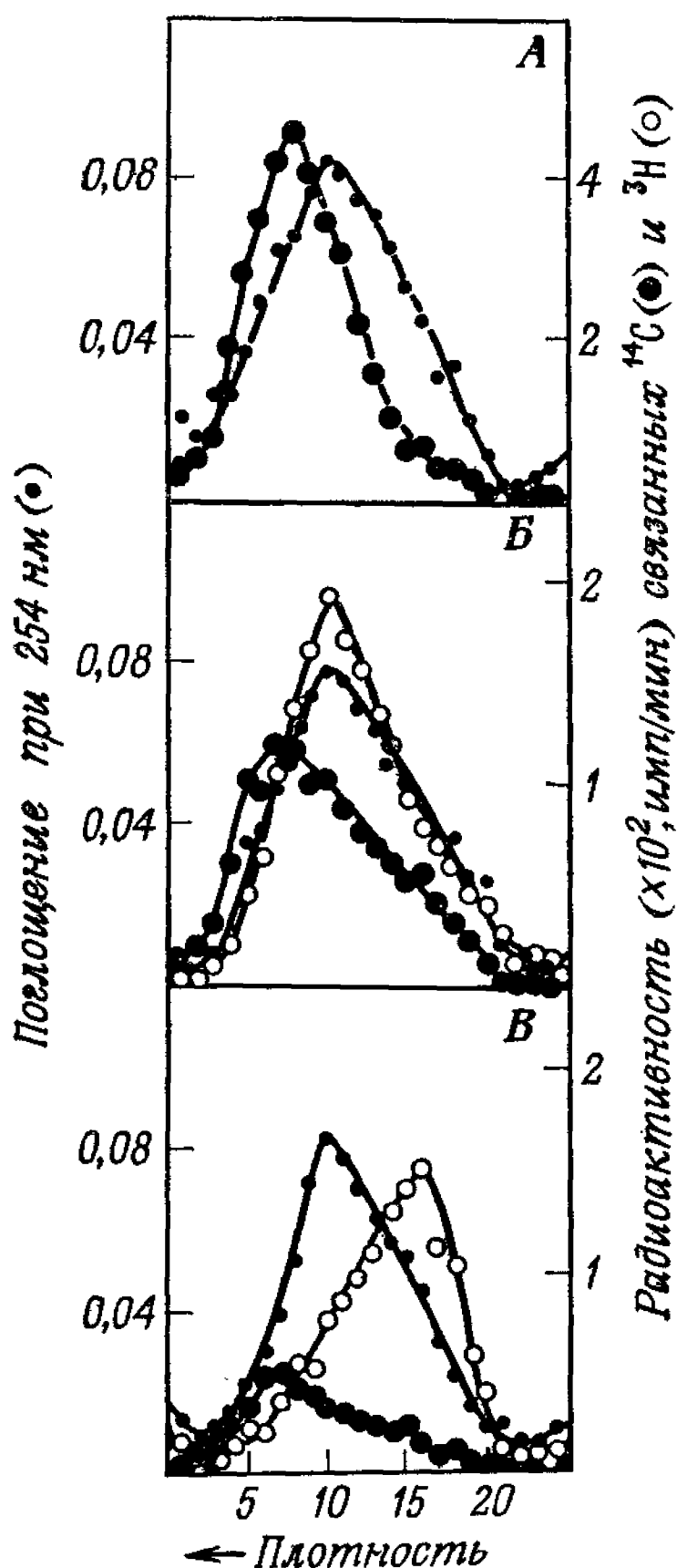


Рис. 16. Преимущественное метилирование повторяющихся участков в транскриптом [39]. А. Седиментация в градиенте CsCl метилированной ядерной ДНК, выделенной в середине фазы S (радиоактивность 5-метилцитозина сдвинута в сторону ДНК с большей плотностью). Б. Гибриды между метилированной ядерной ДНК, выделенной из фракций градиента, и пре-мРНК, комплементарной ко всему транскриптому, содержат 5-метилцитозин. В. Гибриды между теми же фракциями ДНК и мРНК, выделенной из полисом, т. е. комплементарной к уникальному участку транскриптона, почти не содержат 5-метилцитозина. Черные точки — оптическая плотность ДНК; черные кружки — радиоактивность ^{14}C 5-метилцитозина ДНК; светлые кружки — радиоактивность ^3H гибридной РНК.

ные периоды клеточного цикла; митохондриальная ДНК синтезируется в двух фазах — S и G₂; метилирование происходит в старых цепях ДНК в течение той же фазы S; оно распределяется статистически неравномерно и затрагивает главным образом регуляторные гены.

III. Транскрипция и созревание РНК

14. Процесс транскрипции у эукариот

Прежде чем мы перейдем к рассмотрению процессов синтеза и созревания (процессинга) РНК в период интеркинеза, необходимо дать общую картину транскрипции у эукариот.

На рис. 17 представлена упрощенная схема синтеза РНК: расплетание участка двойной спирали ДНК (гена), отделение одной цепи от другой и построение комплементарной РНК на одной из этих цепей при участии ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Когда фермент заканчивает копирование гена, РНК-продукт удаляется, а обе цепи ДНК снова соединяются. Это один из самых поразительных биохимических процессов, но мы еще не знаем, какие факторы вызывают разделение комплементарных цепей ДНК, а после окончания транскрипции снова их соединяют.

Все типы РНК синтезируются одинаковым способом. Синтез РНК идет асимметрично, т. е. транскрипции подвергается только одна из двух цепей ДНК [4]. Этот процесс идет *in vivo* в условиях нормальной жизнедеятельности клетки.

На рис. 18 дана подробная схема процесса транскрипции в эукариотической клетке.

Рибосомальные РНК, как известно, синтезируются в ядрышке. В ядрышках клеток человека имеется, по расчетам, не менее 450 генов для рибосомальной РНК [57].

Ген для рибосомальной РНК 18S и ген для рибосомальной РНК 28S транскрибируются одновременно. Образуется общий предшественник рибосомальной РНК с константой седиментации 45S.

После транскрипции 45S-предшественник подвергается процессингу («созревание») — разделяется на две

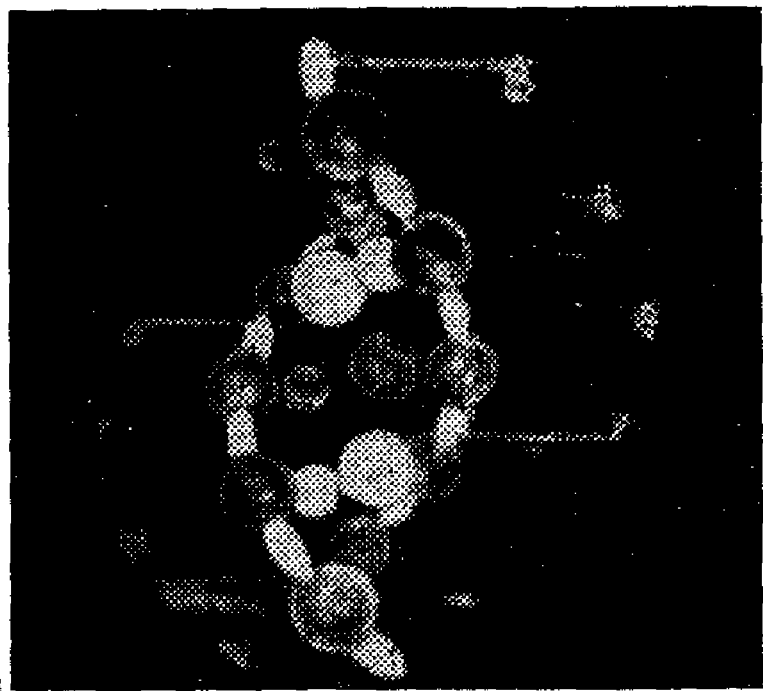
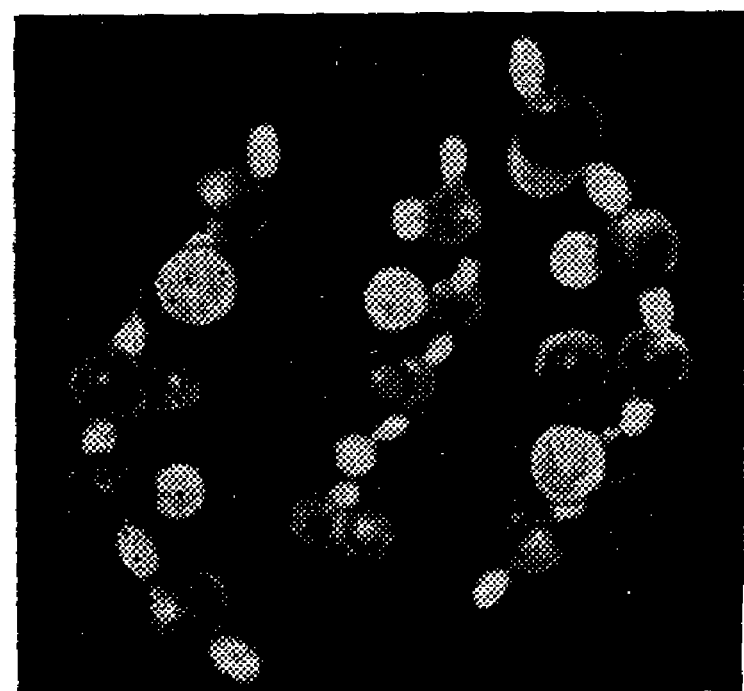
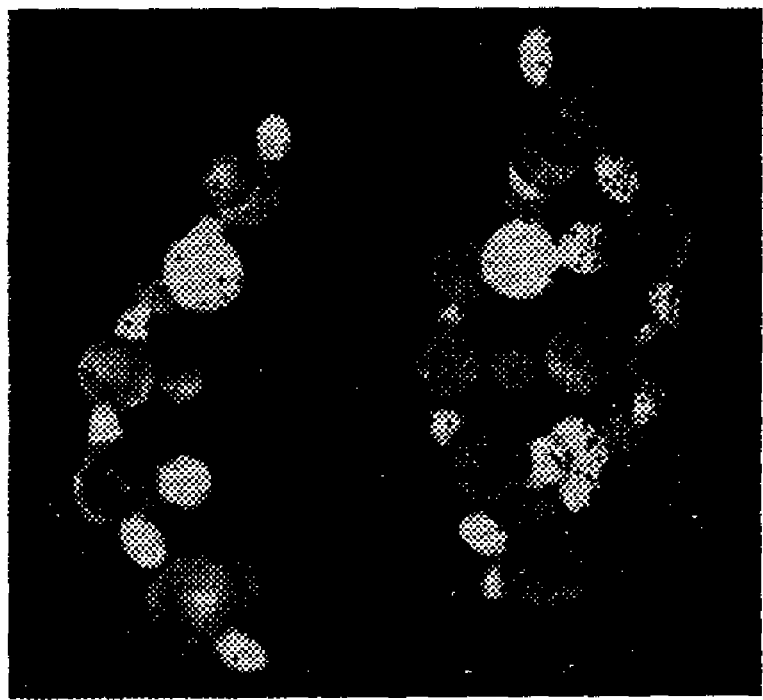
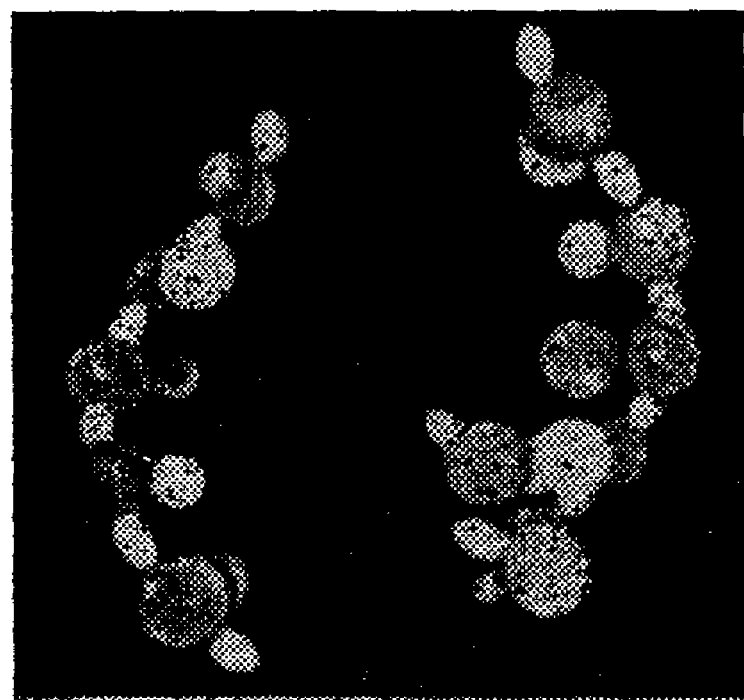
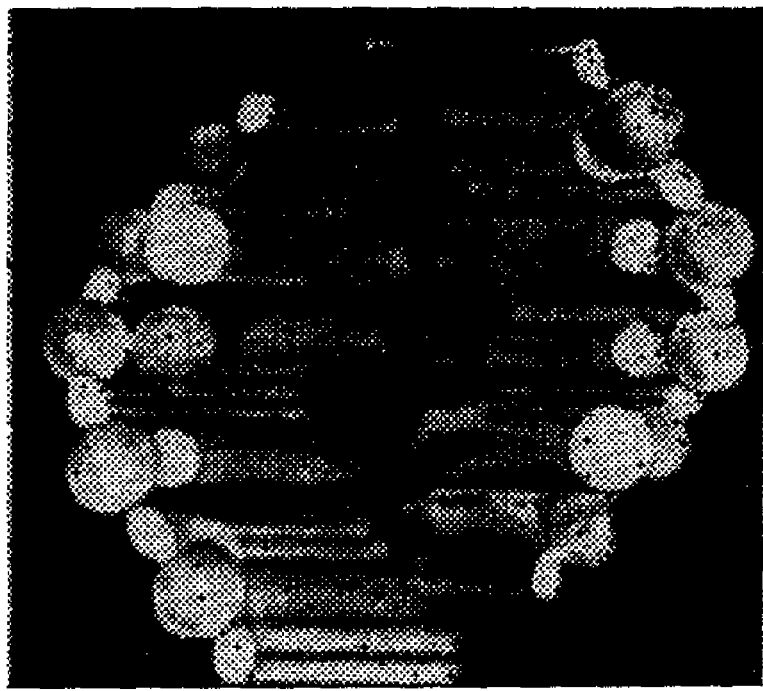
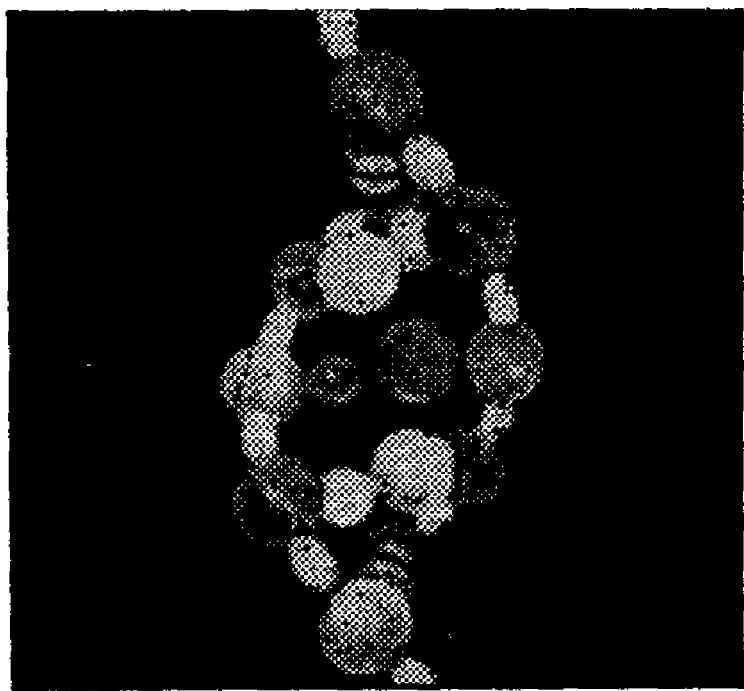


Рис. 17. Асимметричный синтез РНК (Upjohn, Genes in Action, 1966). ДНК, так же как во время своего собственного синтеза, разделяется на две цепи. РНК-полимераза копирует одну из цепей (транскрипция); после окончания транскрипции синтезированная РНК удаляется, а цепи ДНК снова реассоциируют.

функционально активные молекулы (фрагменты 28S и 18S). В процессе созревания РНК участвуют так называемые *процессирующие ферменты*, которые удаляют «лишние» участки 45S-РНК, не соответствующие генам 28S- и 18S-РНК и комплементарные к так называемому спейсеру [58]. Гены рибосомальной 5S-РНК и транспортной 4S-РНК повторены многократно (известно, что в цитоплазматическом пуле находится 20 аминокислот; для каждой из них существует несколько видов тРНК; в одной клетке могут действовать около 60 разных видов тРНК [4]). И наконец, часть геномной ДНК — возможно, около 1% — соответствует структурным генам, которые несут информацию, необходимую для биосинтеза белков.

Как рибосомальная 45S-РНК, так и информационные РНК, комплементарные структурным генам, транскрибируются сначала вместе с последовательностью, комплементарной регуляторным генам транскриптона. Продукт транскрипции называют пре-мРНК [55, 56]. Позже при участии ферментов процессинга часть пре-мРНК, комплементарная регуляторным генам, разрушается, и в результате остается собственно мРНК, которая затем включается в полисомы для трансляции [55].

Эта схема транскрипции послужила основой для описанных выше исследований, касавшихся преимущественного метилирования регуляторных генов (см. рис. 16).

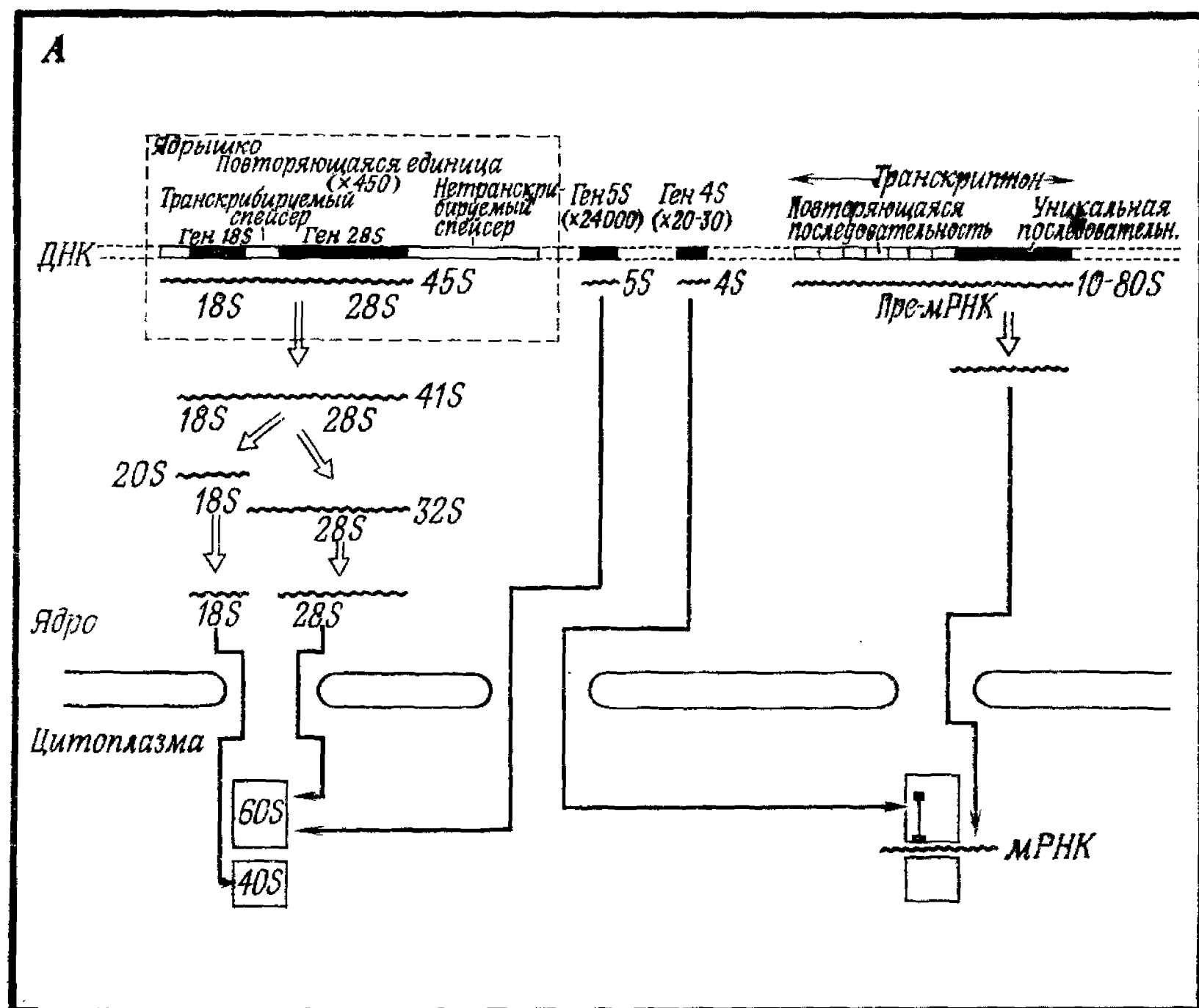
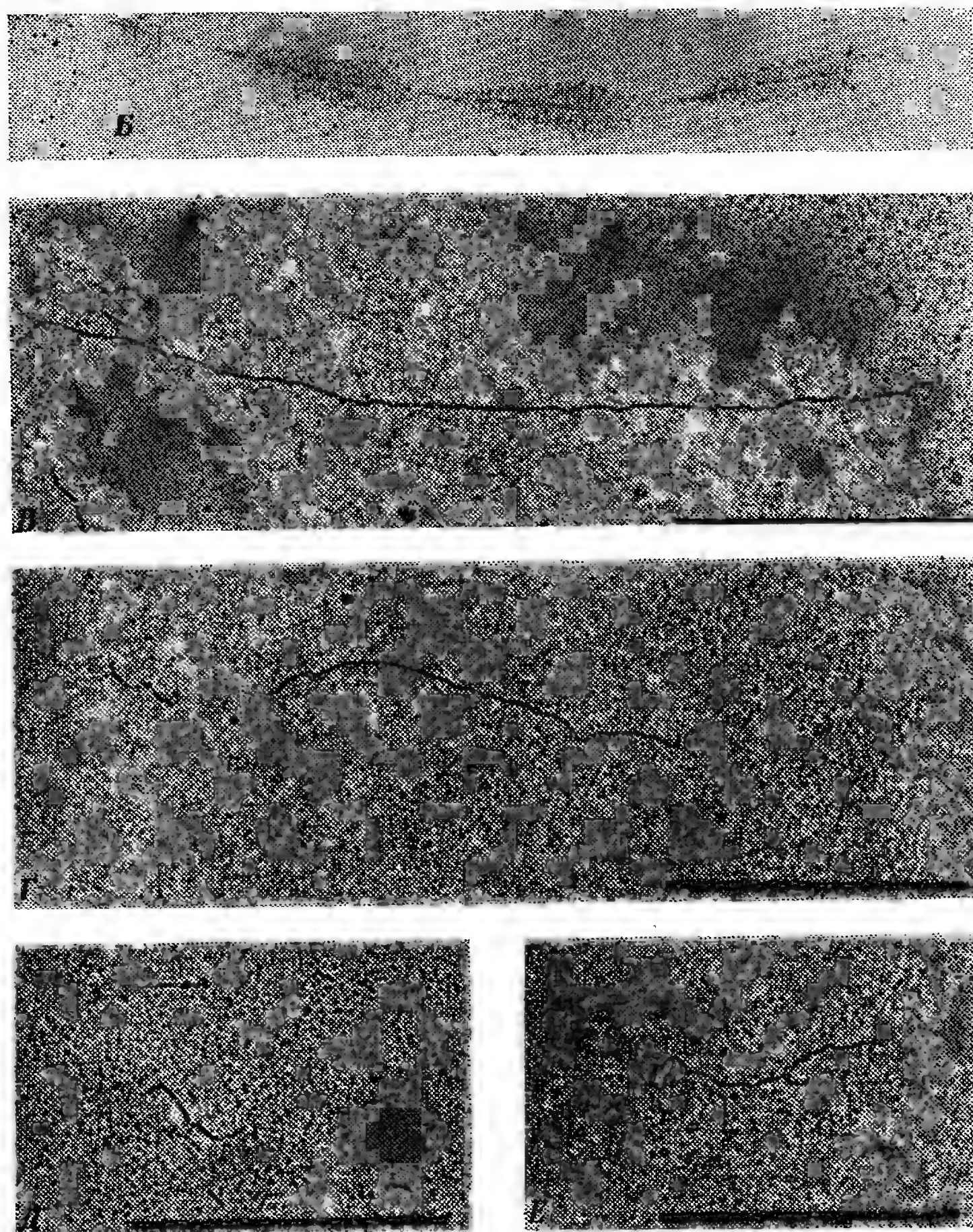


Рис. 18. Схема транскрипции и созревания различных типов РНК у эукариот. Наиболее изучены в этом отношении рибосомальная РНК и информационная РНК. А. Транскрипция и созревание РНК [59]. Б. Повторяющиеся генные участки для рРНК в ядрышке [4]. В—Е. Электронные микрофотографии различных типов рРНК: 45S, 32S, 18S и 28S [4].

15. Временная модель транскрипции и созревания рРНК

Обычная схема транскрипции представляет собой «вертикальную» проекцию ряда последовательных этапов в процессе реализации генетической информации (передача из ядра в цитоплазму). Можем ли мы развернуть



транскрипцию и процессинг «по горизонтали», связав их с хронологией жизни одной клетки?

На рис. 19 представлен анализ в градиенте сахарозы различных классов РНК, выделенных через равные промежутки времени в течение одного клеточного цикла. Первое, что бросается в глаза, — это значительный синтез

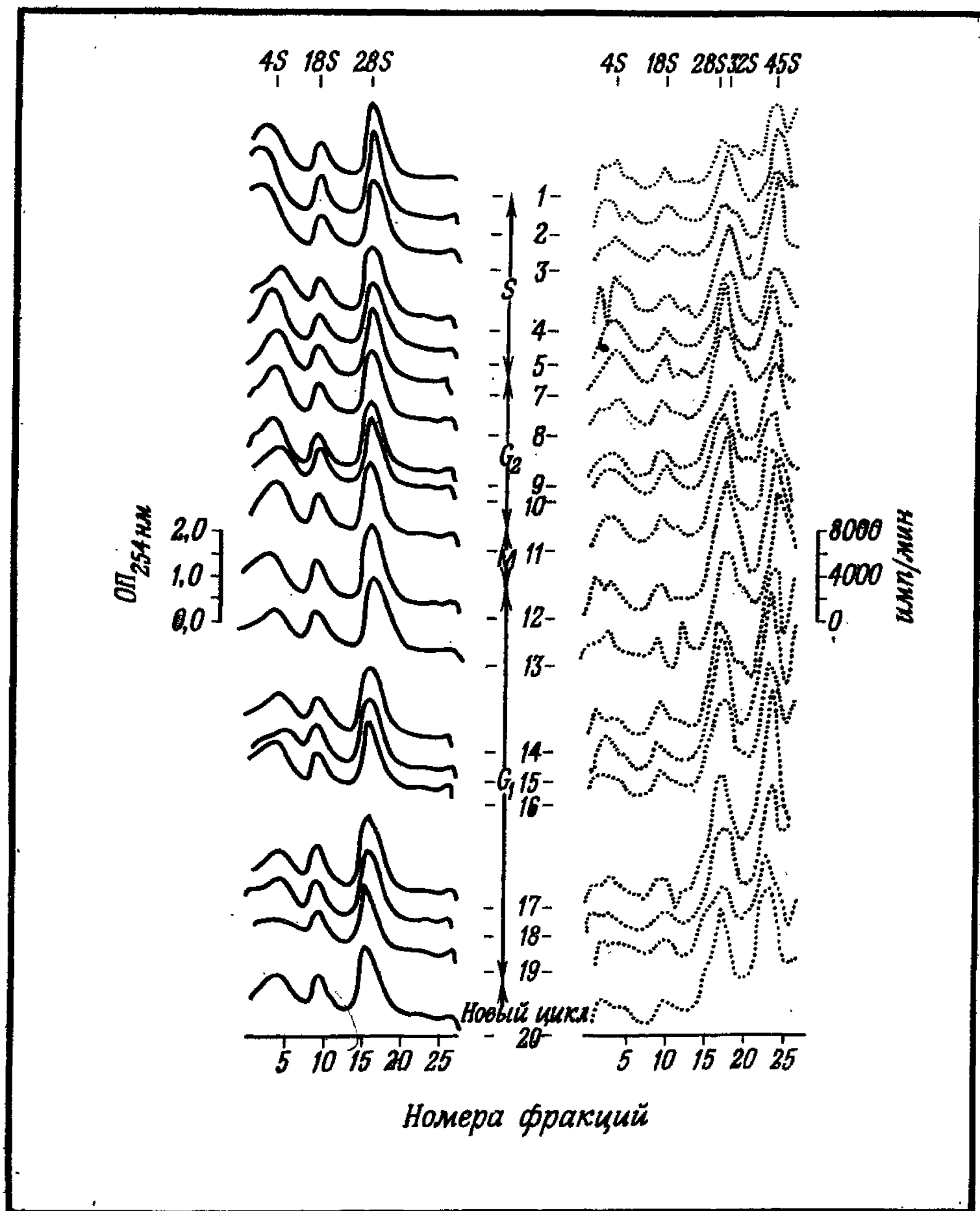


Рис. 19. Исследование в сахарозном градиенте разных типов РНК из клеток HeLa, находящихся в различных фазах клеточного цикла [59]. Периоды инкубации с ^3H -уридином — 50 мин, с интервалами 1 ч. Слева — распределение оптической плотности в сахарозном градиенте; видны пики 4S-тРНК, 18S-рРНК и 28S-рРНК. Справа — радиоактивность этих же РНК, а также предшественников рибосомальной РНК (45S и 32S). В середине на вертикальной линии указаны часы митотического цикла.

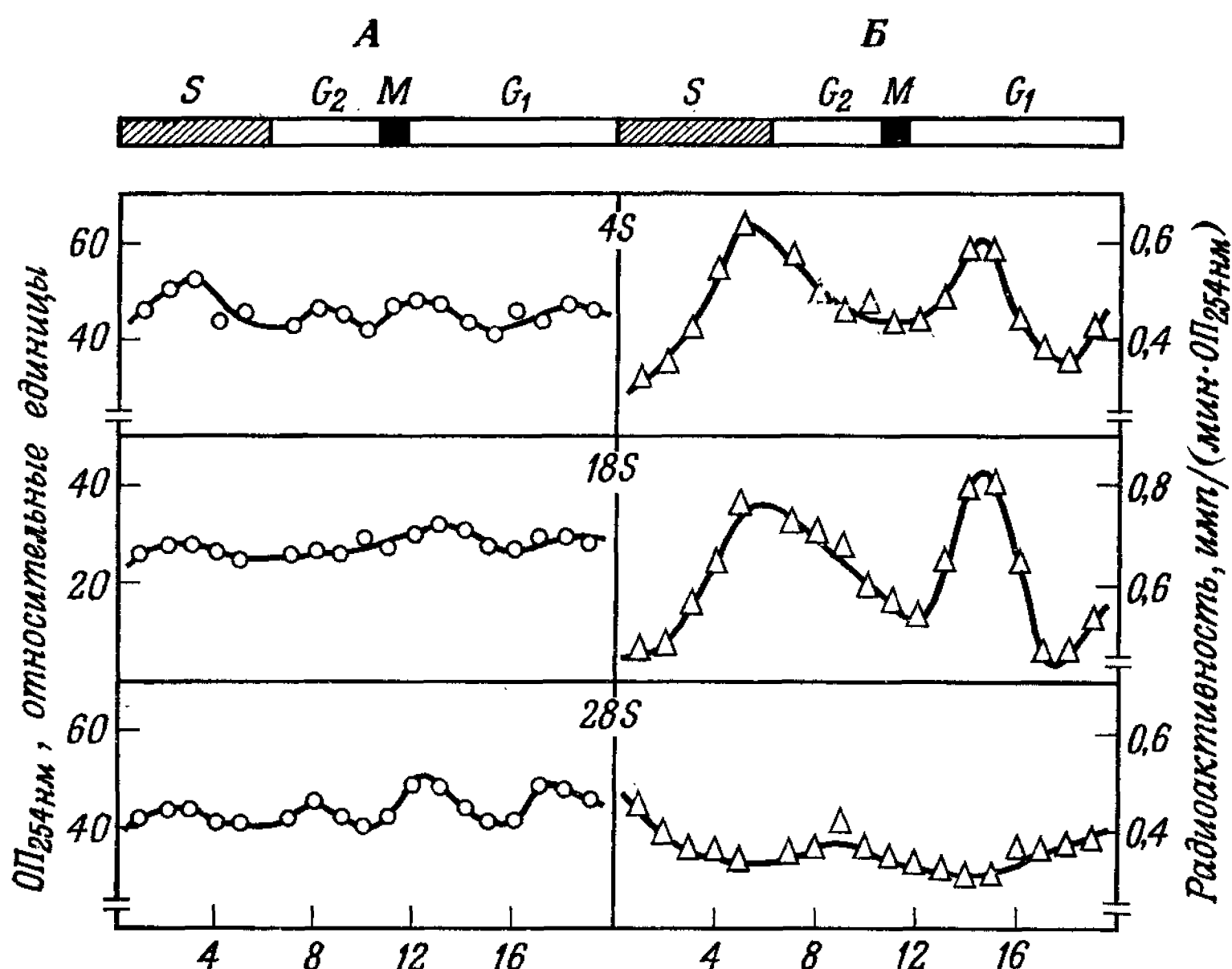


Рис. 20. Относительное содержание РНК 4S, 18S и 28S в одной клетке (А) и скорость их синтеза (Б) на протяжении жизненного цикла клеток HeLa [59].

рибосомальной 45S-РНК во вновь образовавшейся молодой клетке.

На рис. 20 показаны количественные изменения трех основных классов РНК в расчете на одну клетку и скорость их синтеза в периоды интеркинеза и митоза. В то время как относительное содержание 4S-, 18S- и 28S-РНК остается на протяжении клеточного цикла примерно одинаковым (рис. 20, А), скорость их синтеза значительно изменяется. Удивительно то, что синтез 4S-РНК (тРНК) варьирует параллельно с образованием 18S-рРНК, а накопление двух рРНК — 18S и 28S — изменяется независимо (рис. 20, Б).

На рис. 21 показано поведение в течение митотического цикла 45S-рРНК (предшественника 18S- и

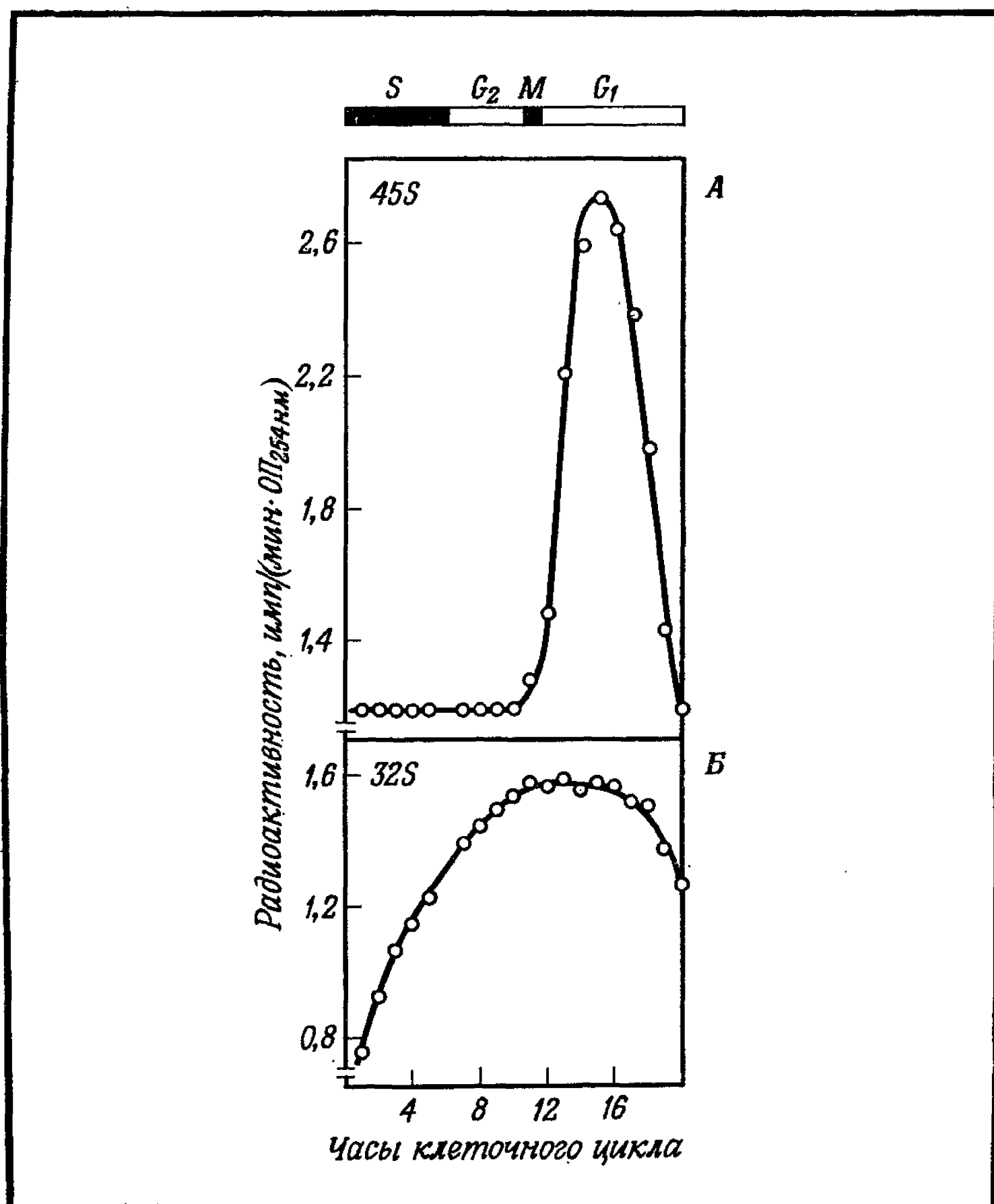


Рис. 21. Отношения между синтезом и созревaniem рибосомальной РНК в течение митотического цикла клеток HeLa [59]. А. Удельная радиоактивность 45S-рРНК. Б. Удельная радиоактивность 32S-рРНК (промежуточного продукта между 45S- и 28S-рРНК).

28S-рРНК) и 32S-рРНК (предшественника 28S-рРНК). В фазе G₁ транскрипция 45S-рРНК идет быстрее, чем ее созревание (рис. 21, А); напротив, в фазах S и G₂ скорость созревания выше скорости синтеза (рис. 21, Б).

В связи с этими данными возникают некоторые соображения относительно так называемого «эффекта дозы» гена [60].

Как известно, у бактерий большему количеству ДНК соответствует больший объем транскрипции [61]. У эукариот это, по-видимому, не всегда так [1, 59]. В фазе G_1 , когда набор ДНК в клетке диплоидный, транскрипция гена 45S-рРНК происходит в относительном избытке (рис. 21, А), а в фазе G_2 , когда набор ДНК тетраплоидный, общая скорость транскрипции снижается относительно процессинга (рис. 21, Б). Не означает ли это, что транскрибируются только те гены рРНК, которые находятся в старых цепях ДНК, а не в новых [59]? Может быть, в фазе G_2 транскрипция новых цепей затруднена в результате специфического взаимодействия ДНК с гистонами, которых в G_1 еще нет, так как они образуются в фазе S?

Общая картина транскрипции и созревания различных классов РНК, в частности рибосомальной РНК, на протяжении клеточного цикла представлена на рис. 22 в форме «орбит» [1]. Синтез 45S-рРНК достигает максимума в фазе G_1 , а образование 32S-рРНК — в фазе G_2 . 28S-рРНК, предшественником которой служит 32S-рРНК, образуется равномерно в течение всего цикла. Между тем в выработке 18S-рРНК из 45S-предшественника имеется два максимума — ранний, в начале фазы G_1 , и поздний — на границе фаз S и G_2 . Таким образом, кинетика образования 18S- и 28S-рРНК из 45S-рРНК различна.

Как уже говорилось, удивителен и пока остается без объяснения параллелизм между «орбитами» рибосомальной 18S-РНК и транспортной 4S-РНК.

Рассматривая на рис. 22 всю систему орбит, трудно не восхищаться гармоничностью хода событий на протяжении клеточного цикла. Жизнь клетки представляется строго организованной: в самом начале фазы G_1 , по-видимому, активируется синтез рРНК-полимеразы; при переходе в фазу S образование этого фермента как будто репрессируется и в то же время начинает действовать ДНК-полимераза; в фазах S и G_2 происходит процессинг рибосомальной РНК.

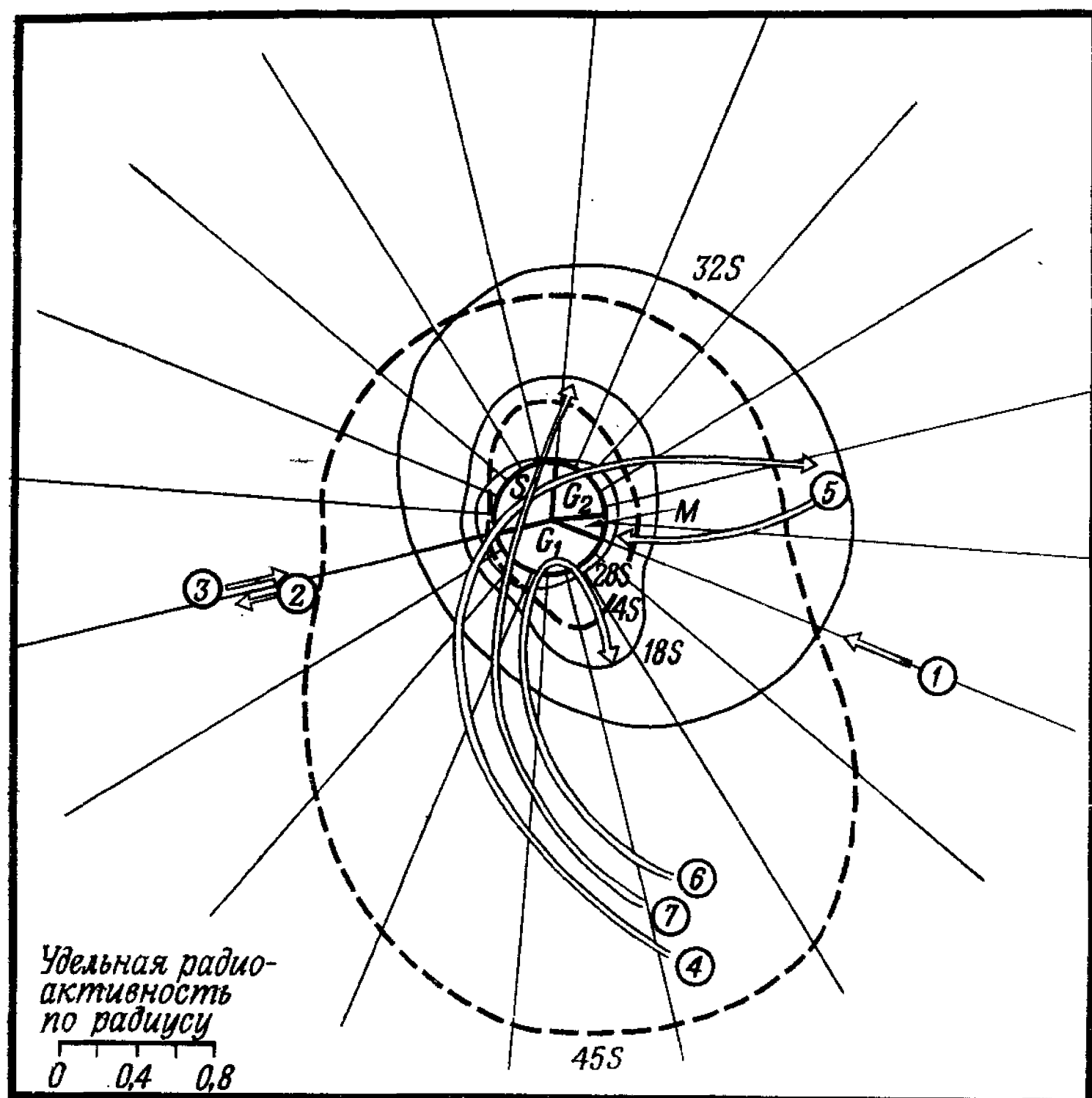
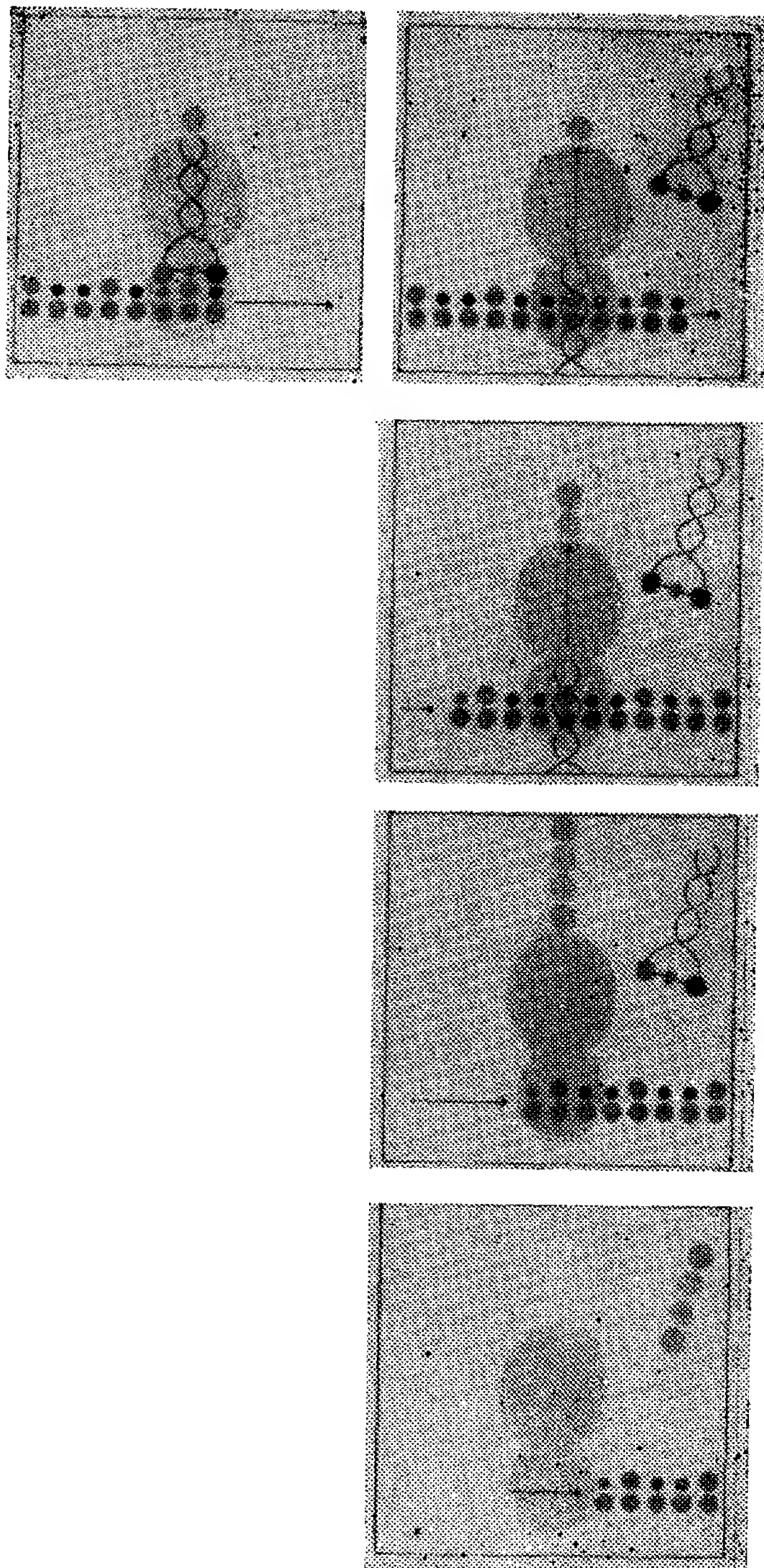


Рис. 22. «Орбитальная» модель распределения процессов синтеза и созревания рибосомальной РНК в течение митотического цикла клеток HeLa [1]. Клеточный цикл представлен последовательностью фаз G_1 , S, G_2 и M. Время (в часах) указывают радиусы, сходящиеся к круговой оси абсцисс, которая подразделена на соответственные фазы цикла. Ординаты отложены на тех же радиусах (масштаб дан внизу слева) и соответствуют удельной радиоактивности (для разных типов РНК). Стрелками указаны следующие моменты цикла: регуляция двух полимераз — для рРНК (1 и 2) и для ДНК (3); регуляция ферментов, катализирующих превращение 32S- в 28S-рРНК (4 и 5) и 20S- в 18S-рРНК (6 и 7). Внешние «орбиты» вокруг абсциссы соответствуют следующим РНК (от центра к периферии): 28S, 4S, 18S, 32S и 45S. Под «орбитой» подразумевается процесс, происходящий в течение клеточного цикла асимметрично по отношению к фазе M.

Можно, видимо, сформулировать непреложное правило: *в клетке происходит либо репликация ДНК, либо синтез РНК.*

Что касается информационных РНК (мРНК), то они образуются на протяжении почти всего клеточного цикла [62]. Но так как мРНК составляет лишь около 1% всей РНК, очевидно, что она не может заметно влиять на ход кривых, представленных на рис. 22.



Биосинтез белков. В то время как мРНК продвигается у поверхности малой субчастицы рибосомы, транспортные РНК доставляют к «сборочному конвейеру» все новые и новые аминокислоты. По окончании этого процесса мРНК отходит от рибосомы, а образовавшийся пептид освобождается.

IV. Трансляция

16. Регулирование трансляции на протяжении клеточного цикла

На рис. 23 схематически представлена судьба информационных РНК, которые выходят из ядра в законченном виде для выполнения своих функций в цитоплазме [63]. После транскрипции, модификации и процессинга информационная РНК переходит из ядра в цитоплазму и нанизывает на себя определенное число рибосом, образуя полисому (рис. 24) — своего рода конвейер, который начинает синтезировать белки.

Мы изучали трансляцию на полисомах в различные моменты клеточного цикла; мы хотели не только установить, на какое время приходятся максимумы общего синтеза белков, но и выяснить некоторые детали функционирования самих полисом.

На рис. 25 представлены кривые распределения в сахарозном градиенте рибосом, выделенных в последовательные моменты клеточного цикла. Из полученных данных было вычислено количество рибосомальных 40S- и 60S-субчастиц, 80S-рибосом и полисом в расчете на одну клетку (рис. 26).

Соотношение «полисомы : 80S-мономеры : 40S- и 60S-субчастицы» в фазе G_2 возрастает — почти все рибосомальные субчастицы объединяются в моносомы, а из моносом в то же время образуются полисомы [64].

Высокая концентрация полисом в фазе G_2 по сравнению с фазой G_1 (рис. 26) позволяла предполагать, что соответственно в исходной родительской клетке должен иметь место более интенсивный белковый синтез, чем в молодых дочерних клетках. Однако результаты проверки этого предположения оказались неожиданными. Как видно из рис. 27, в фазе G_1 синтез полипептидов на полисомах идет гораздо активнее, чем в фазе G_2 . Таким обра-

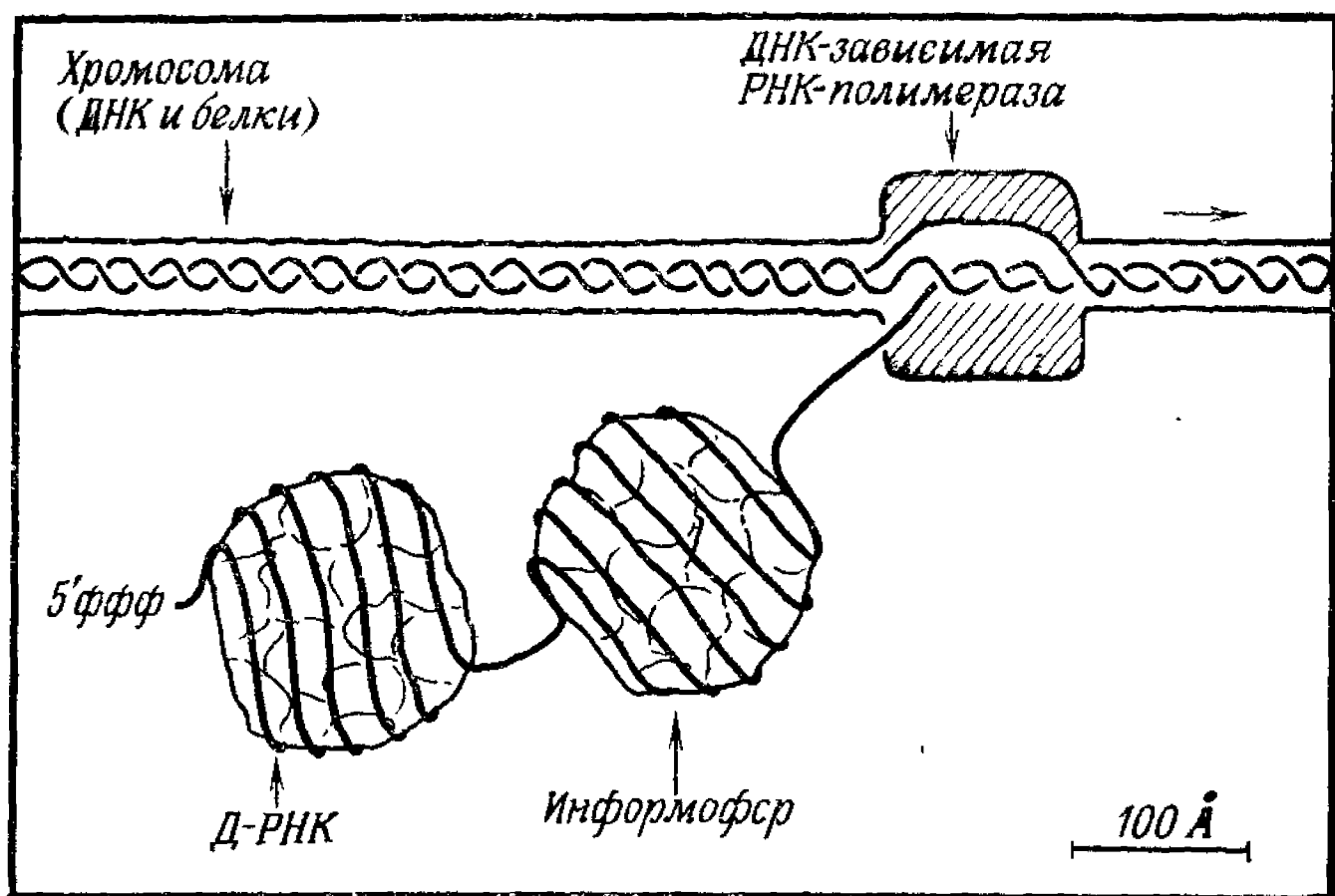


Рис. 23. Схема переноса информации из ядра в цитоплазму [63]. Информационная РНК, уложенная вокруг белка — так называемого информофера, — происходит через поры ядерной мембраны. Комплекс мРНК — информофер называют *информосомой*. Количество мРНК на одном информофере соответствует примерно $0,2 \cdot 10^6$ дальтон.



Рис. 24. Электронные микрофотографии полисом. А. Небольшие пентамерные полисомы из ретикулоцитов кролика (Rich, Scientific American, 171, 1—11, 1963). Б. Спиральные полисомы ($\times 67\,000$), встречающиеся в небольшом количестве в определенные моменты жизни клетки (Monpegon, Advances in Cytopharmacology, 1, 131—144, 1974). Возможно, что такие полисомы сохраняют в течение фазы митоза до новой фазы G_1 мРНК, синтезированную в фазе G_2 [64].

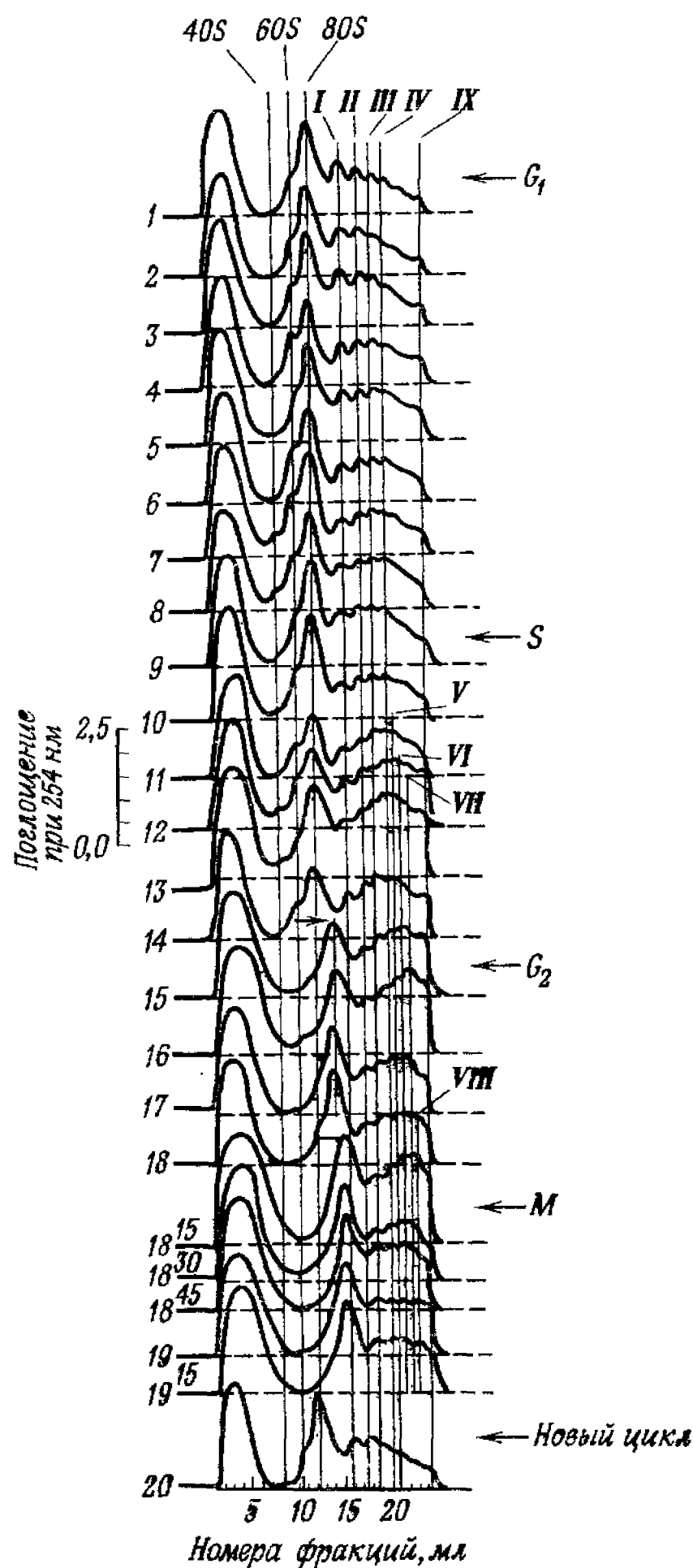


Рис. 25. Анализ в сахарозном градиенте рибосомальных субчастиц 40S и 60S, моносом 80S и полисом 95—380S на протяжении жизненного цикла клеток HeLa [64]. Слева указаны часы клеточного цикла; справа отмечены фазы G₁, S, G₂ и M. Римскими цифрами сверху обозначены типы полисом (димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры и т. д.).

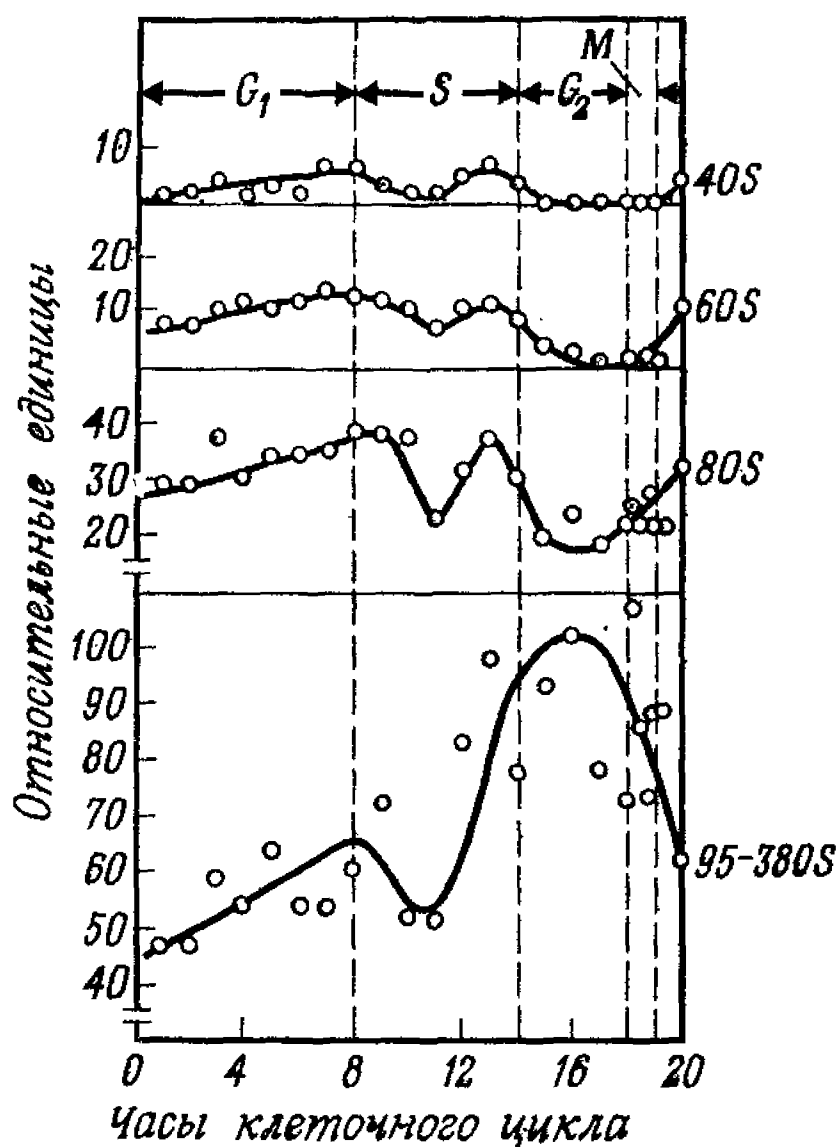


Рис. 26. Содержание рибосомальных субчастиц 40S и 60S, мономером 80S и полисомом 95—380S в клетках HeLa на протяжении их жизненного цикла [64].

зом, меньшему количеству полисом на одну клетку в фазе G₁ соответствует более высокая скорость белкового синтеза, а большему количеству полисом в фазе G₂ — меньшая скорость синтеза.

Кроме того, поскольку в фазе G₂ мы находим гораздо более крупные полисомы, чем в фазе G₁ (рис. 25), возникает вопрос, одинакова ли скорость передвижения рибосом вдоль цепи мРНК в малых и больших полисомах [64]. Сравнив рис. 26 и 27, можно предположить, что эта скорость обратно пропорциональна длине мРНК [64]. Отбрасывая любые гипотезы и исходя из экспериментальных данных (рис. 25 и 26), можно составить следующие уравнения [1]:

1) для клетки, находящейся в фазе G₁ или S



2) для клетки в фазе G₂



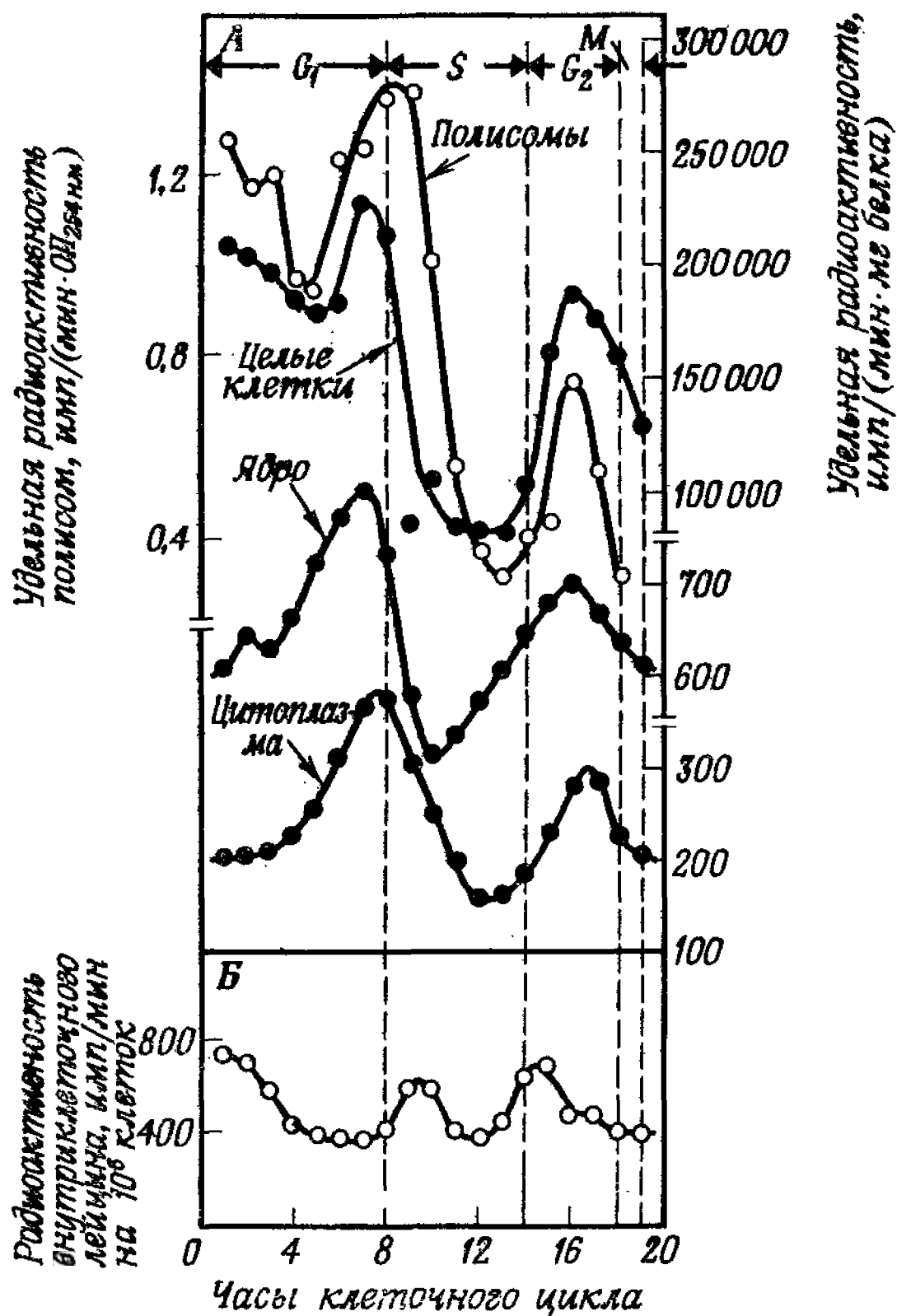


Рис. 27. Удельная радиоактивность полисом, общего клеточного белка, белков ядер и цитоплазмы (А) в сопоставлении с внутриклеточным содержанием лейцина (Б) в различные периоды клеточного цикла HeLa [64]. На графике А радиоактивность отражает включение ^3H -лейцина в полисомы и белки (за 3 мин). На графике Б представлена радиоактивность ^3HCl -дансила, связанного с лейцином, как показатель концентрации последнего в пуле растворимых аминокислот.

Иными словами, в «старой» клетке происходит активная мобилизация субчастиц рибосом для построения моносом с последующим быстрым образованием полисом.

И наконец, рис. 27 показывает, что биосинтез белков наиболее интенсивно протекает в двух фазах клеточно-

го цикла — G_1 и G_2 . Напротив, в фазе S , для которой характерен синтез ДНК, отмечается спад белкового синтеза. Таким образом, еще раз подтверждается правило «или ДНК, или белок» [64].

17. Макромолекулярные синтезы в клеточном цикле пересекаются в системе «орбит»

На рис. 28 показана хронология различных этапов передачи генетической информации. Макромолекулярные синтезы, происходящие на протяжении клеточного цикла, представлены здесь в виде пересекающихся орбит [1]:

- а) ядерная ДНК реплицируется в фазе S ;
- б) митохондриальная ДНК реплицируется частично в период синтеза ядерной ДНК, а частично в фазе G_2 ;
- в) метилирование старых цепей ядерной ДНК происходит одновременно с синтезом новых цепей ДНК в фазе S ;
- г) рибосомальная РНК (составляющая 80% всей РНК) синтезируется главным образом в фазе G_1 (так что в клеточном цикле соблюдается правило «или ДНК, или РНК»);
- д) синтезированная рРНК подвергается процессингу (в фазе G_1 преобладает ее синтез, в фазе G_2 — процессинг; таким образом, здесь соблюдается принцип «или синтез рРНК, или ее созревание»);
- е) что касается белков, то их синтез происходит в фазах G_1 и G_2 и резко понижен в фазе S (орбита белкового синтеза не идет параллельно с орбитой синтеза ДНК, но она параллельна орбите синтеза рРНК). Это указывает еще на две закономерности клеточного цикла: «или ДНК, или белок» и «когда РНК, тогда и белок».

Процесс транскрипции, как правило, не перекрывается с процессом дупликации генов, тогда как трансляция может идти одновременно с транскрипцией.

На рис. 28 отражен еще один важный феномен: фаза митоза (M) в клеточном цикле представляет собой период относительной инертности, наступающий после окончания молекулярных синтезов [1].

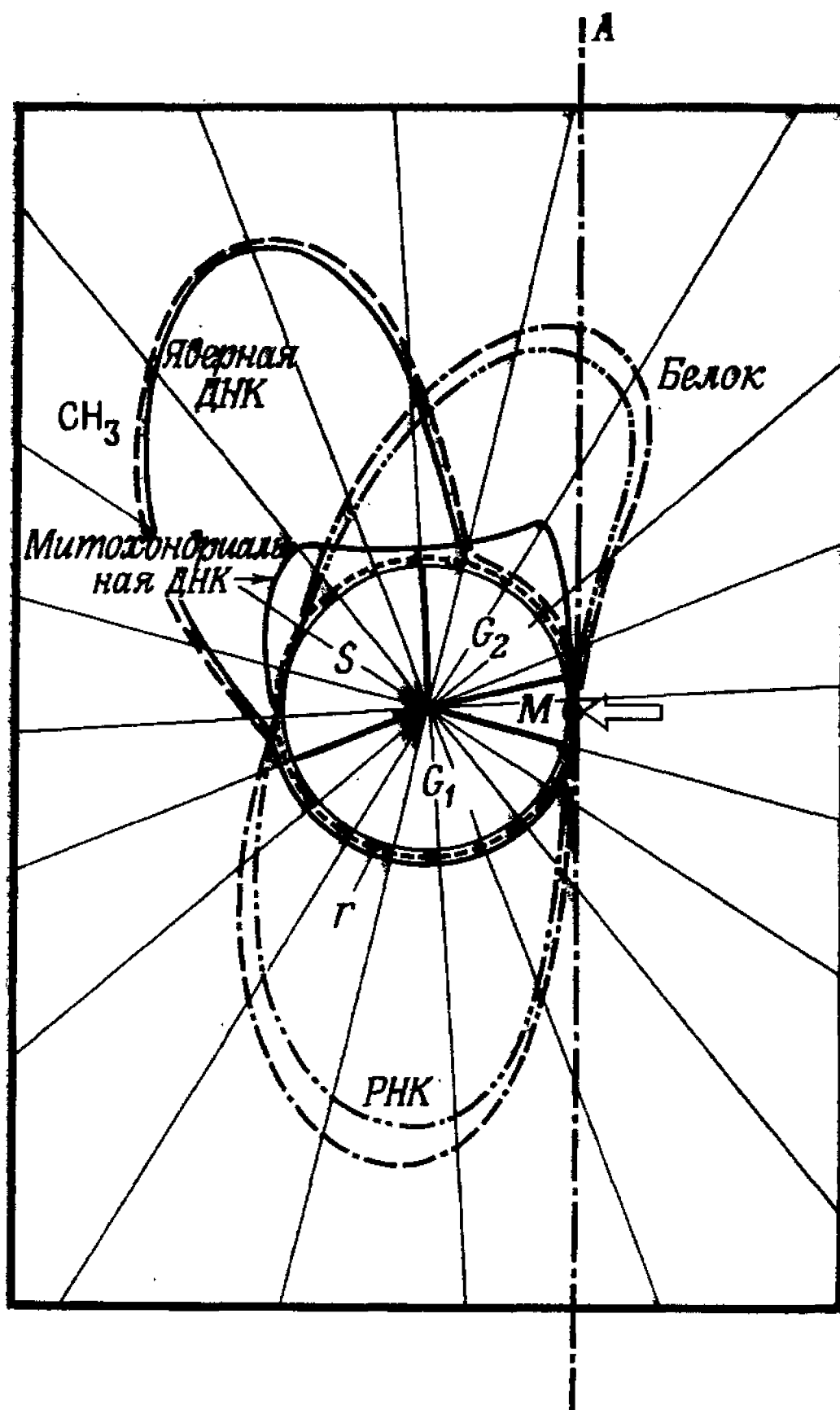
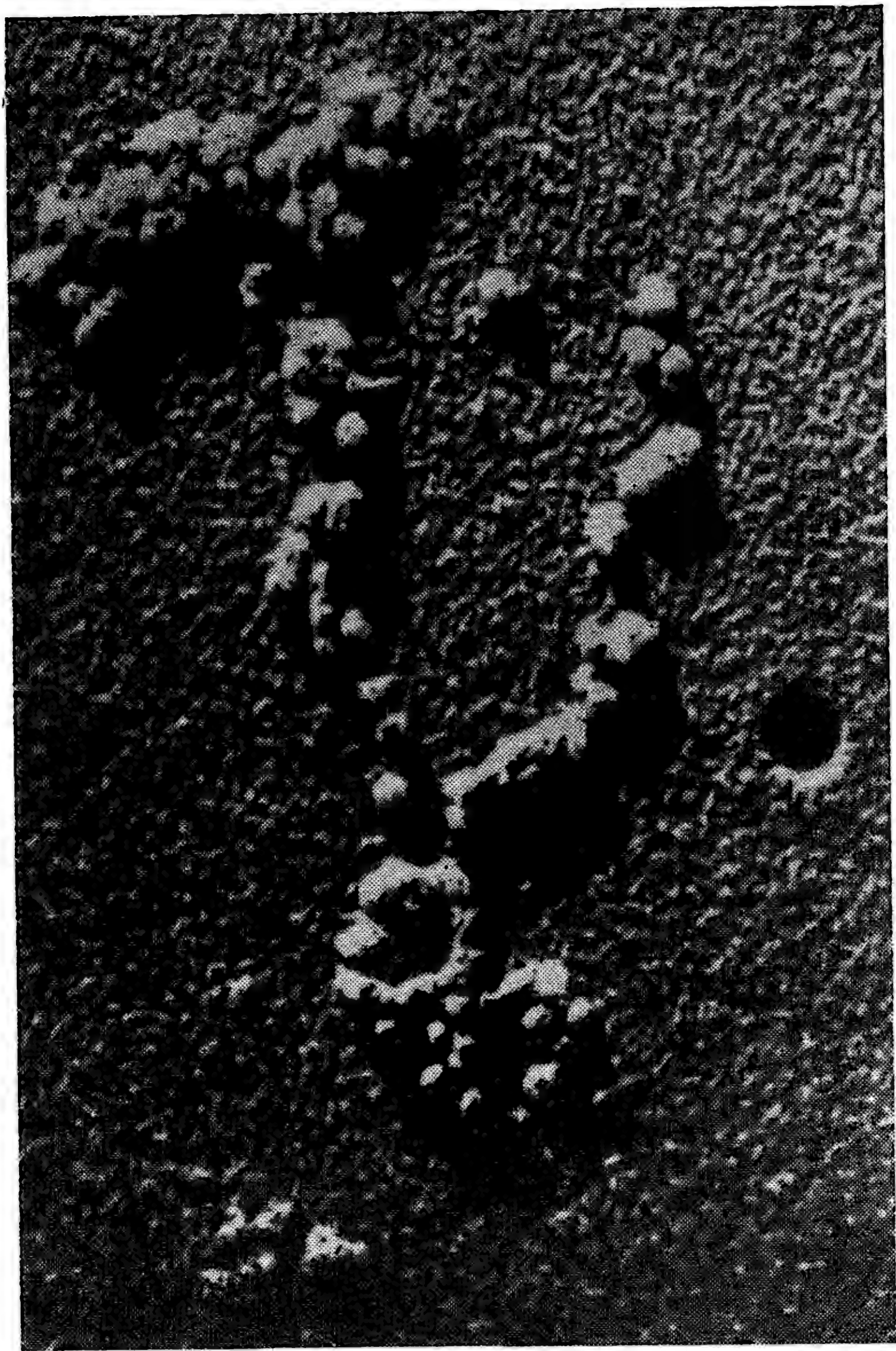


Рис. 28. «Орбитальная модель» распределения макромолекулярных синтезов в жизненном цикле клеток HeLa [1]. Координаты такие же, как на рис. 22. Стрелкой указана точка асимметрии («инертная» точка) макромолекулярных синтезов (фаза М). А — линия асимметрии. «Орбиты»: - - - - репарация ядерной ДНК (постоянна в течение клеточного цикла); ——— репликативный синтез ДНК (для ядерной ДНК максимум в фазе S, для митохондриальной ДНК в фазах S и G₂); — — — — метилирование ядерной ДНК (максимум в фазе S); — · · · — · — транскрипция и - - - - - трансляция, с апогеями орбиты в фазах G₁ и G₂.

Это несколько изменяет наше представление о клетке, основанное на данных морфологии. Действительно, в морфологическом плане фаза М выглядит как динамичный период со сменой различных подфаз (профазы, метафазы, анафазы и телофазы), в то время как интеркинез внешне представляется периодом «покоя» из-за исчезновения видимых хромосом. Все это заставило нас обратиться к внутренней «геометрии» эукариотических клеток, основанной на динамической модели процессов репликации генов, транскрипции и трансляции, развертывающихся на протяжении клеточного цикла [1].

Разумеется, эта «геометрия» не могла не рассматриваться как новая аналитическая основа, с одной стороны, для изучения макромолекулярных взаимодействий между вирусом и клеткой и, с другой стороны, для дальнейшего развития *генетической инженерии* и *химиотерапии злокачественных опухолей*, поскольку, как мы увидим, многие цитостатические препараты являются фазо-специфическими.



Гигантские полисомы, организованные на РНК полиовируса в клетках HeLa (Darnell et al., *Perspectives in Virology*, vol. IV, p. 16—33, 1965).

V. Литическая вирусная инфекция

18. Всегда ли возможно заражение клетки вирусом, вызывающим литическую инфекцию?

Рассмотрим взаимодействие между РНК-содержащим вирусом и эукариотической клеткой на примере вируса полиомиелита и клеток HeLa. Где может находиться в соответствии с «орбитальной» схемой (см. рис. 28) специфический момент клеточного цикла, удобный для проникновения вируса и успешного развития инфекции?

Легко понять, что не может быть безразлично, в какой фазе вирус проникнет в клетку — в G_1 или G_2 , в М или S. Геометрическая гармония «орбит» должна была бы нарушиться при вмешательстве вируса, проникшего в клетку извне.

По-видимому, геном полиовируса — одноцепочечная РНК [65], ведущая себя внутри клетки-хозяина как мРНК [66], — не может не вступать в конкуренцию с клеточными мРНК, например за связывание с рибосомами, необходимыми для его трансляции [1]. Следовательно, «законы» клеточного микрокосма (рис. 28) должны измениться, если в клетку проникнет *экзогенная* мРНК, происходящая не из клеточного ядра, а из внешней среды (см. рис. 3).

При участии вирусной мРНК в цитоплазме клетки-хозяина образуются белки капсида вирусной частицы (как известно, у полиовируса капсид состоит из четырех белков: VP_1 , VP_2 , VP_3 и VP_4) в ущерб синтезу клеточных белков. Но *как* и *когда* это происходит?

Для ответа на этот вопрос проводились опыты с заражением синхронных культур клеток HeLa вирусом в различные моменты клеточного цикла [67, 68].

Были получены следующие результаты. Так называемые «ранние события» (*прикрепление* вируса к клеточной мембране, его *внедрение* и *лизис* вирусного капсида с ос-

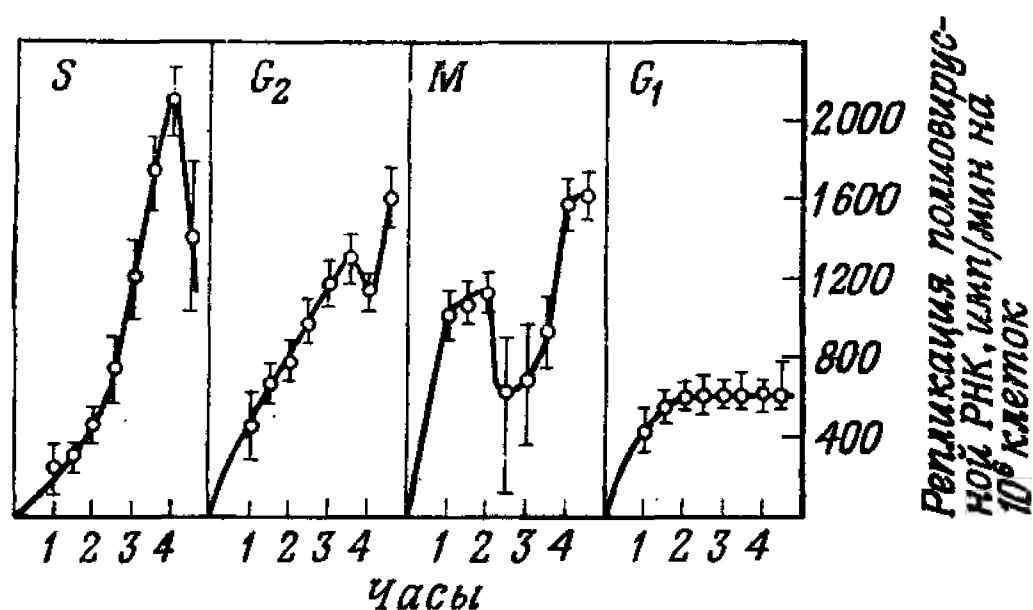


Рис. 29. Бимодальная кривая репликации полиовирусной РНК в клетках HeLa [68]. Полиовирусная РНК включала ^3H -уридин на фоне ингибирования транскрипции в клетке-хозяине актиномицином D. В период 0—2 ч (от начала инфекции) реплицируется комплементарная, или негативная, РНК полиовируса (РНК⁻). Между 2 и 4 ч реплицируется позитивная полиовирусная РНК (РНК⁺) для построения дочерних частиц.

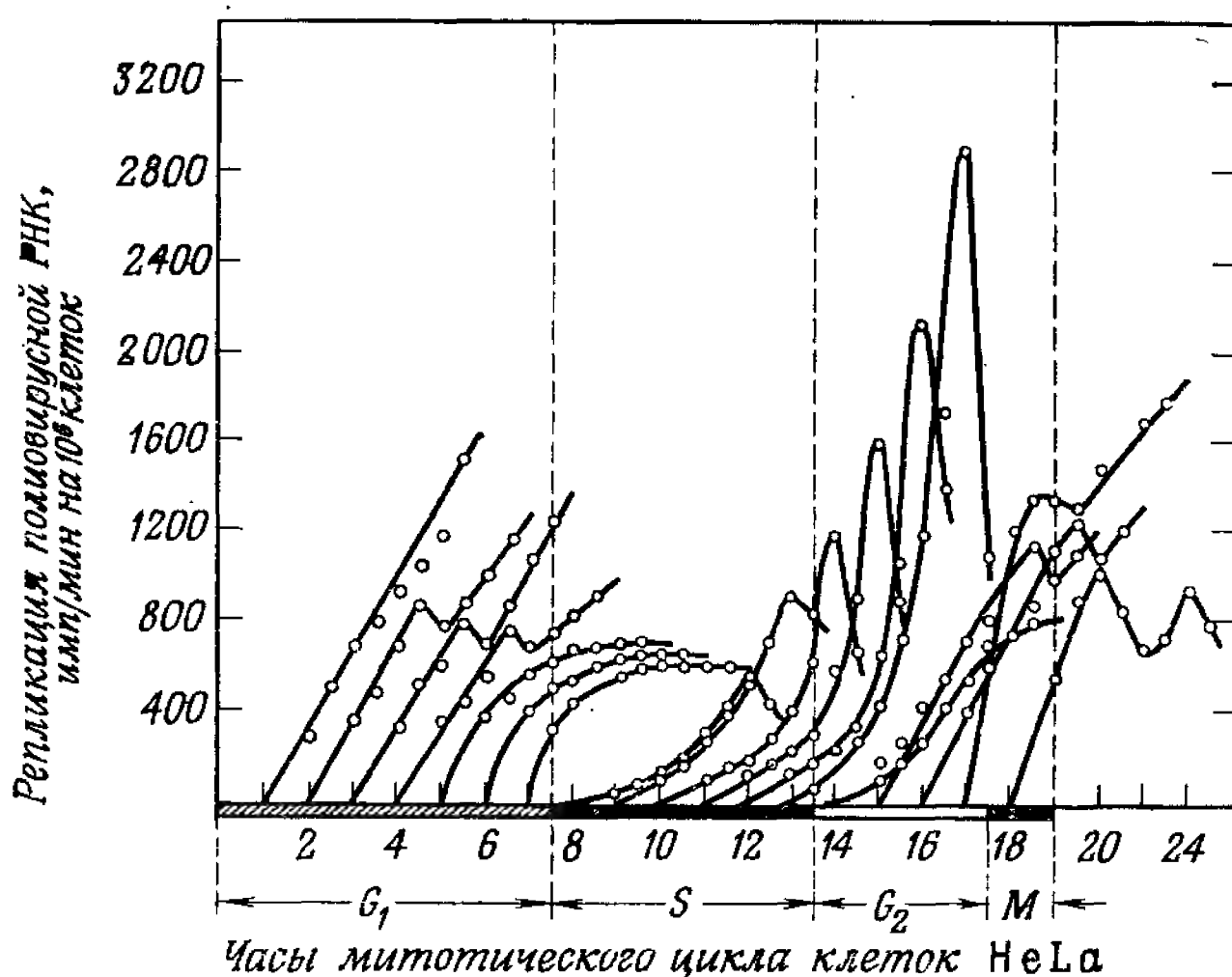


Рис. 30. Кривые репликации полиовирусной РНК в разные периоды жизненного цикла клеток HeLa [67]. В фазе S второй пик (от 2 до 4 ч) бимодальной кривой репликации резко преобладает над первым пиком (0—2 ч).

вобождением генома в цитоплазме) могут происходить в любой период жизни клетки. Это означает, что мембрана клетки всегда позволяет вирусу проникнуть внутрь и ферменты, лизирующие белковую оболочку вируса, действуют все время, от одного деления клетки до другого [67, 68].

Так называемая «инициация» репликации вируса также может осуществляться на протяжении всего клеточного цикла [67, 69].

Геном полиовируса представляет собой мРНК⁺. После раздевания вириона в цитоплазме клетки-хозяина эта мРНК⁺ должна реплицироваться с образованием комплементарной мРНК⁻; в результате получается промежуточная структура — двухцепочечная молекула, называемая «репликативной формой» вирусной РНК. Эту фазу репликации, вероятно, катализирует фермент, который можно было бы назвать РНК⁺-зависимой РНК⁻-полимеразой [1, 67, 78]. На комплементарной мРНК⁻ строятся новые цепи вирусной РНК⁺, возможно при участии другого фермента — РНК⁻-зависимой РНК⁺-полимеразы [1]. Действительно, кривая репликации полиовирусной РНК носит биомодальный характер (рис. 29). Первый пик, между 0 и 2 ч с момента инфекции, соответствует синтезу вирусной РНК⁻. Второй пик, между 2 и 4 ч с момента инфекции, соответствует синтезу РНК⁺ [67, 68].

На рис. 30 ясно видно, что комплементарная цепь полиовирусной РНК (РНК⁻) может образовываться на протяжении всего цикла, «положительная» же цепь (РНК⁺) нового генома вируса синтезируется только в определенный период [67, 68]. Действительно, если первый пик возникает в течение всего митотического цикла, то второй пик, соответствующий синтезу РНК⁺, появляется и постепенно увеличивается только в фазе S, а затем вновь исчезает.

Представленная картина, которая впервые выявила наличие в клеточном цикле специфического момента для развития вирусной инфекции, была полностью подтверждена другими исследователями [70—75]. Настоящая работа, способствовавшая разрешению десятилетнего спора между Львовым и Таммом [76, 77], показала, что в репликации полиовируса участвуют, по-видимому, две РНК-

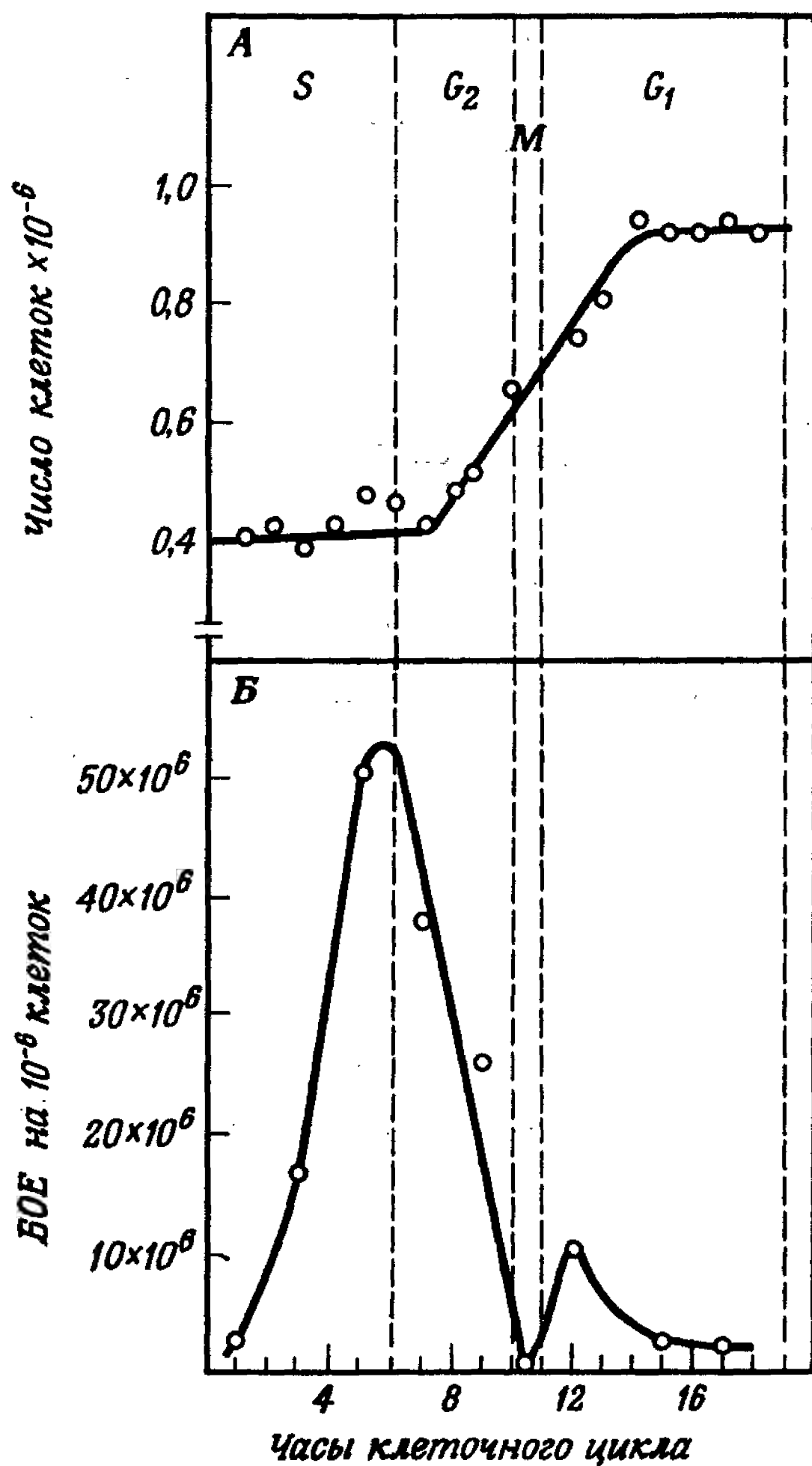


Рис. 31. Образование зрелых частиц полиовируса в течение жизненного цикла клеток HeLa [68]. А. Плотность синхронной клеточной культуры. Б. Выход полиовируса. БОЕ — число бляшкообразующих единиц.

полимеразные системы. Одна из них — «РНК⁺-зависимая РНК-полимераза» — нечувствительна к гуанидину, а другая — «РНК⁻-зависимая РНК⁺-полимераза», действующая в фазе S, — нуждается в гуанидине [78].

Последним этапом развития полиовирусной инфекции является образование белков оболочки (капсида). К большому удивлению, опыты показали, что эти белки (VP₁, VP₂, VP₃ и VP₄), кодируемые, очевидно, вирусной РНК⁺, синтезируются одновременно с синтезом той же РНК⁺, т. е. в фазе S [67], а не в период синтеза клеточных белков, который происходит в других фазах — G₁ и G₂ (см. рис. 28).

Возможное объяснение этого парадокса носит лишь предварительный характер. Вероятно, полиовирусным РНК⁺ было бы легче «захватывать» рибосомы в фазе S, когда они свободны, так как в этот период клетка синтезирует ДНК, а не белки [1]. Как показывает кривая роста вируса (рис. 31), в это же время, в фазе S, происходит и сборка новых вирионов.

19. Нарушение хронологии процессов трансляции в клетке при литической вирусной инфекции

Несовпадение во времени синтеза вирусных белков и синтеза белков, кодируемых генами клетки, пока еще не получило объяснения и может рассматриваться лишь как факт. То, что происходит в случае литической инфекции, является отклонением от основных принципов «орбитальной» системы, представленной на рис. 28.

Полученные результаты можно кратко резюмировать следующим образом.

1. В то время как клеточная рибосомальная РНК в основном синтезируется в фазе G₁, вирусная РНК⁻ синтезируется в течение всего клеточного цикла. В отличие от этого РНК⁺ образуется только в фазе S. Таким образом, на вирусную РНК не распространяется принцип «или ДНК, или РНК»: процессы дупликации клеточного генома и размножения вирусных генов могут происходить параллельно.

2. Если синтез клеточных белков происходит главным образом в фазах G_1 и G_2 , то синтез вирусных белков осуществляется в фазе S. Следовательно, к вирусным белкам неприменим принцип «или ДНК, или белок». Другими словами, трансляция вирусного генома (мРНК) может идти одновременно с репликацией генов клетки.

Таким образом, при литической вирусной инфекции в фазе S может разыгрываться ряд одновременных событий — репликация генов клетки, репликация генов вируса, их транскрипция и трансляция [1].



Нормальный кариотип человека. XX — половые хромосомы женского набора; XY — половые хромосомы мужского набора. Способны ли хромосомы человека, подобно хромосомам животных клеток, включать в себя геном онкогенного вируса? В какие хромосомы он включается? В какой период?

VI. Онкогенная вирусная инфекция

20. Новая экспериментальная база для генетической инженерии

Рассмотрим значение описанных выше исследований для понимания вирусного канцерогенеза (в частности, процесса интеграции ДНК онкогенного вируса с ДНК клетки-хозяина) и роли так называемых «гомологичных» зон онковирусной РНК и клеточной ДНК.

Обратимся к экспериментам с неравномерным метилированием ДНК [1]: CH_3 -группы не включаются случайным образом по всей длине ДНК-полимера, а концентрируются преимущественно в определенных генах [39].

Эта избирательность была использована для специфической маркировки ДНК, чтобы выяснить, *когда, где и как* происходит интеграция генома онкогенного вируса с геномом клетки [1]. Как известно, явление интеграции было впервые описано в 1968 г. Дульбекко и его сотрудниками [79, 80]: двухцепочечная ДНК онкогенного вируса, например SV40, включившись в геном, вызывает трансформацию нормальной клетки.

Первый вопрос (*когда?*) касался фазы клеточного цикла, в которой возможен процесс интеграции [1]. К его постановке привели два открытия: в 1967 г. Ричардсон обнаружил, что в клетке небольшие фрагменты ДНК могут соединяться с помощью фермента, получившего название ДНК-лигазы [32]; в 1968 г. японский ученый Окаки установил, что ядерная ДНК в фазе S клеточного цикла не реплицируется сразу в виде длинных цепей — новая ДНК строится отдельными фрагментами [33]. Сопоставление этих данных позволило заключить, что в фазе S фрагменты Окаки соединяются при участии ДНК-лигазы [33]. В связи с этим возник вопрос: быть может, ДНК онковируса, проникнув в нормальную клетку не в

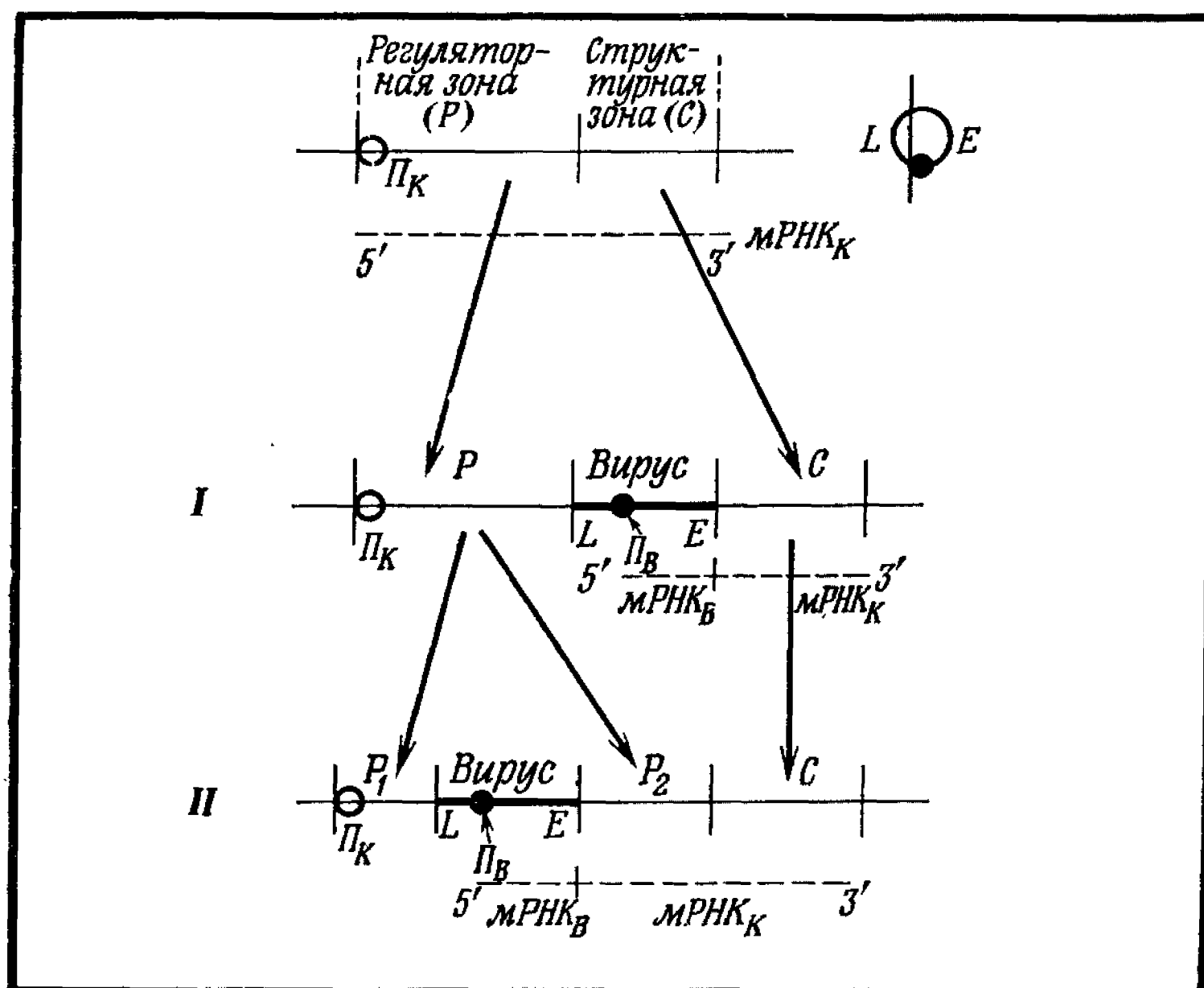


Рис. 32. Возможные схемы включения онковирусной ДНК в область транскриптона [1]. I — полная утрата регуляции; II — частичная утрата регуляции. П — промотор; К и В — означают «клеточный» и «вирусный» соответственно.

фазе S, сначала находится в состоянии «покоя» в ожидании фазы S, когда она смешивается с фрагментами Оказаки в единый пул, чтобы затем включиться в клеточную ДНК с помощью ДНК-лигазы? Иными словами, предполагалось, что интеграция могла бы происходить в период, когда клетка занята сборкой своих фрагментов Оказаки [1]. Изучение процесса интеграции онкогенной ДНК, по-видимому, подтвердило эту гипотезу [1].

Второй вопрос (где?) касается места включения ДНК онкогенного вируса в геном клетки. Была сделана попытка установить, в каких участках более вероятна интеграция вирусной ДНК — в области регуляторных генов или

же в области структурных генов клетки. Как показали предварительные результаты исследований, вероятными местами включения онковирусных геномов являются регуляторные гены [1, 81, 82].

Третий вопрос — каким образом происходит интеграция? — логически вытекает из предыдущего. Как уже отмечалось, транскрипционная единица ДНК (транскриптон) состоит из регуляторной зоны с повторяющимися последовательностями и структурной зоны, представляющей собой уникальную последовательность [55]. ДНК-зависимая РНК-полимераза начинает транскрипцию с 5'-конца (от промотора) и продвигается к 3'-концу. Исходя из этого, можно представить себе два варианта интеграции онковирусной ДНК (рис. 32): а) включение между регуляторной и структурной зонами (интеграция вирусной ДНК в структурной зоне маловероятна); б) включение в регуляторной зоне.

Рассмотрим случай интеграции онковирусной ДНК между регуляторной и структурной зонами. РНК-полимераза начнет транскрипцию от вирусного промотора, минуя клеточный промотор. В результате образуется гетерогенная (химерная) РНК, часть которой будет комплементарна ранним генам вируса (начиная от вирусного промотора), а другая часть — структурному гену клетки. Таким образом, структурный ген клетки полностью выйдет из-под контроля ее регуляторных генов; регуляция его будет утрачена [1].

Рассмотрим теперь вариант с включением онкогенной ДНК в регуляторную зону. РНК-полимераза всегда будет начинать транскрипцию с вирусного промотора, не затрагивая промотор клетки. При этом будут транскрибироваться ранние гены вируса, часть регуляторной зоны и весь структурный ген. В этом случае утрата регуляции будет не полной, а лишь частичной.

По имеющимся данным [79, 80], с клеточной ДНК может интегрироваться до 6—7 вирусных геномов. Из этого ясно, как важно было бы выяснить фактическую степень нарушения регуляции и установить, какие белки при этом затронуты. Не касается ли это, например, синтеза тех белков, которые ответственны за контактное торможение?

В этом направлении уже ведутся исследования, но достоверных результатов пока не получено. Имеются более четкие, но все еще только предварительные данные о локализации «гомологичных» зон — зон специфического взаимодействия между клеточной ДНК и онкогенным вирусом [1, 39, 81, 82]. В этих работах в качестве маркера ДНК опять-таки было использовано неравномерное метилирование клеточной ДНК [39].

Очевидно, что интеграция возможна и в случае заражения онкогенным вирусом, содержащим РНК, — после образования комплементарной вирусной ДНК [86] при участии обратной транскриптазы [83—85]. В конце 60-х годов французские исследователи [87—89] установили, что в клеточной ДНК существуют последовательности, комплементарные онковирусной РНК.

Это открытие породило ряд умозрительных гипотез. Было даже высказано предположение, что онкогенные вирусы — это не что иное, как продукты эволюции генома эукариот: ими могли бы стать отдельные фрагменты клеточной ДНК, получившиеся в результате спонтанных делений клеточного генома, дефектов рекомбинации, мутаций, вызванных облучением, и т. п.; некоторые из таких фрагментов без дальнейшего преобразования могли бы превратиться в ДНК-геномы опухолеродных вирусов, а другие — после предварительной транскрипции в РНК с помощью определенных транскриптаз — могли бы стать геномами подобного же рода вирусов, содержащих РНК.

Помимо очевидного теоретического интереса, связанного с гипотезой о таком пути биологической эволюции («от клетки к вирусу»), данные о естественной гомологии между онкогенной РНК и нормальной ДНК эукариот [87, 89] послужили основой для ряда экспериментов, имевших целью найти специфический локус взаимодействия между вирусным и клеточным геномами.

Метилированную ДНК клеток млекопитающего гибридизировали с РНК вируса саркомы Рауса [1, 39, 81, 82]. Как показал один из вариантов такого опыта (рис. 33), возможно, что РНК вируса находит гомологичные себе зоны главным образом в тех местах, где ДНК клетки метилирована [81]; во втором варианте опыта (рис. 34) данные о кинетике ассоциации клеточной ДНК

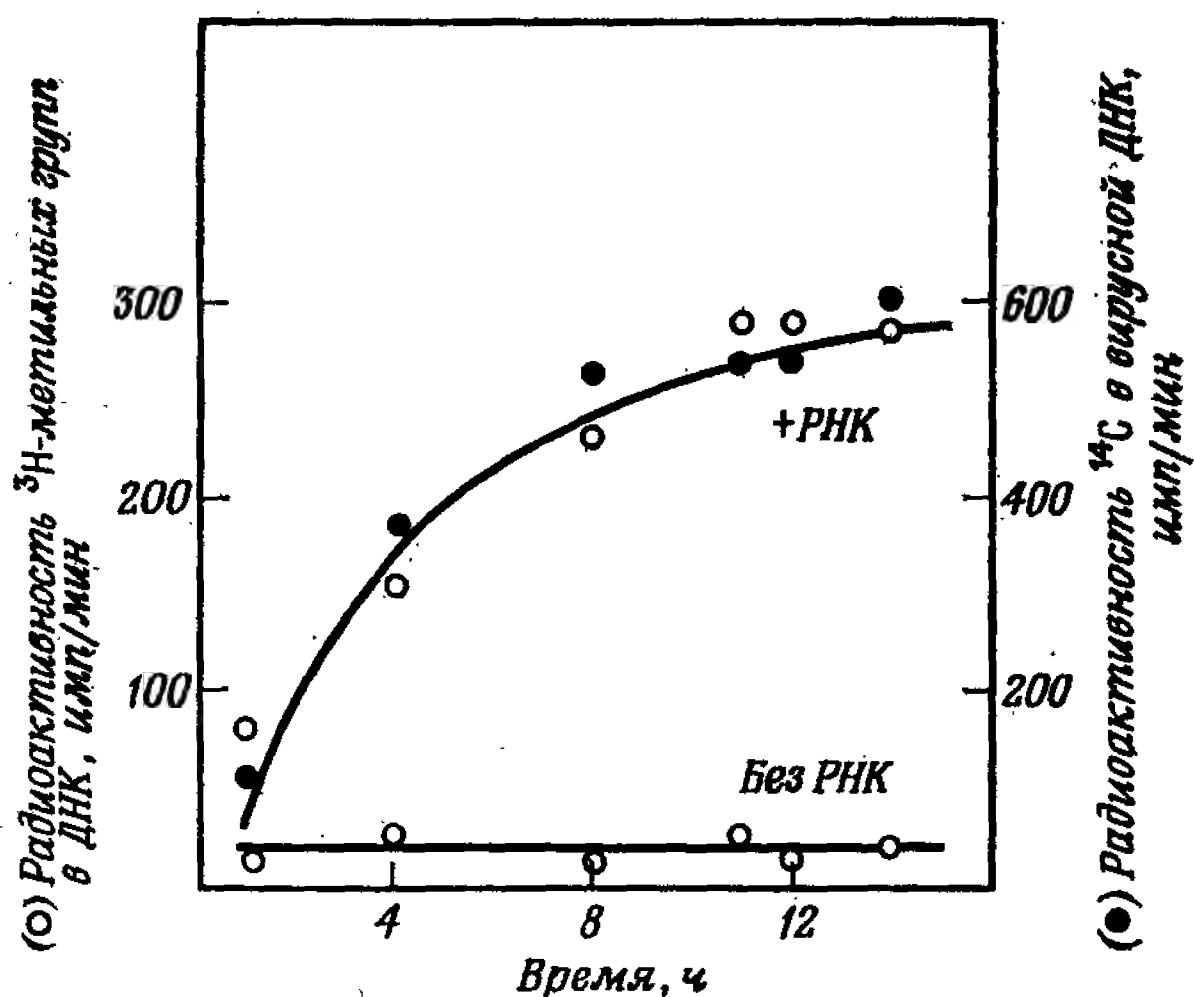


Рис. 33. Гибридизация метилированной ДНК из ядер печеночных клеток мыши с РНК вируса саркомы Рауса [81, 82]. Гибриды (с вирусной РНК) имеют двойную метку ^3H и ^{14}C ; контрольная ДНК (без вирусной РНК) несет только метку ^3H -5-метилцитозина. [Метилированная ядерная РНК (мол. вес. $\sim 1\,000\,000$) — 50 мкг; вирусная РНК (мол. вес $9,6 \cdot 10^6$) — 50 000 имп/мин.]

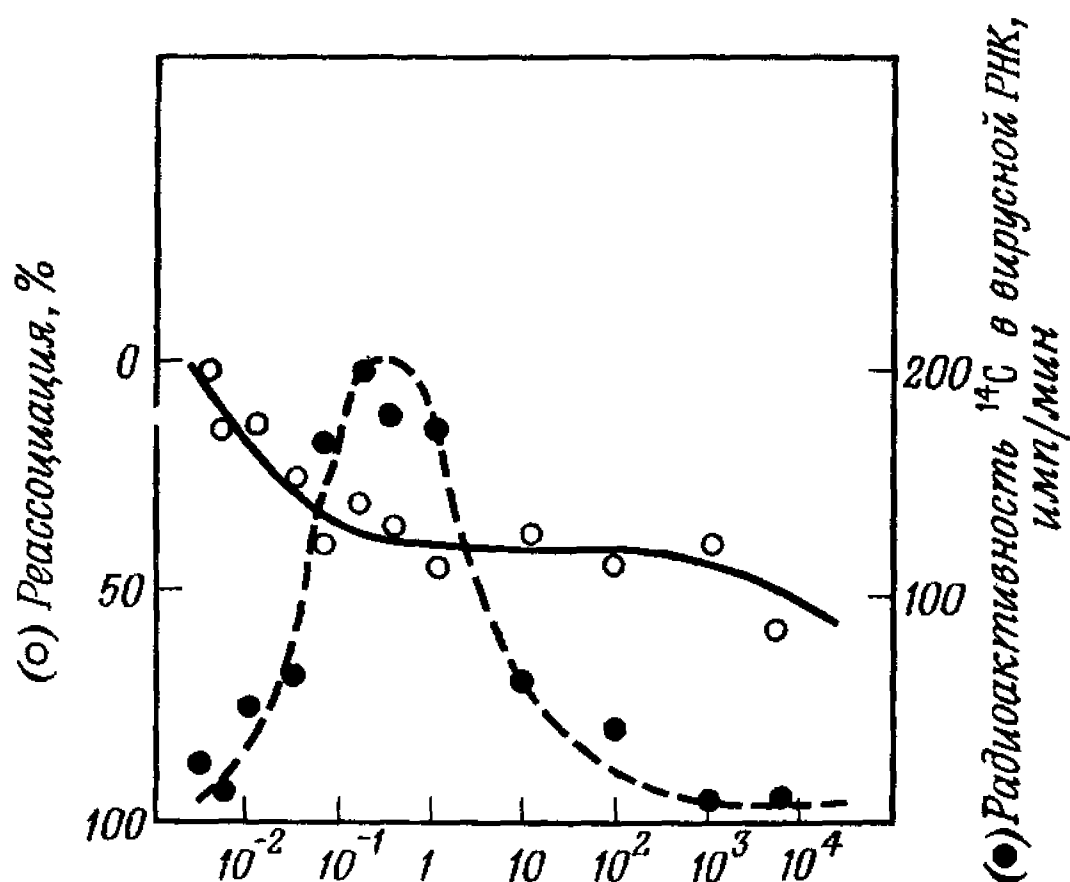


Рис. 34. Кинетика гибридизации ядерной ДНК из печени мыши с РНК вируса саркомы Рауса [81, 82]. Вирусная РНК гибридизируется преимущественно с ДНК, содержащей повторы. [Ядерная ДНК — 50 мкг, вирусная РНК — 50 000 имп/мин.]

с онковирусной РНК показали, что гомологичная зона находится в последовательностях ДНК, характеризующихся определенной степенью повторности ($Cot\ 10^{-1}—10^{-2}$) [82].

Сопоставление результатов этих двух экспериментов позволяет высказать предположение, что наиболее вероятно взаимодействие онковирусов с регуляторными участками транскриптонов клеточной ДНК [1]. Действительно, эти регуляторные зоны не только содержат повторы [55], но и подвержены преимущественному метилированию [39]. Это не противоречит тому факту, что интеграция вирус-специфичной ДНК (продукта обратной транскрипции вирусной РНК) происходит в фракции эухроматина [90].

21. Эволюция и инволюция оперона

Полученные результаты неизбежно приводят к ряду соображений, касающихся не только молекулярных механизмов трансформации, но и теоретических вопросов относительно перехода от оперона одного типа (у прокариот) [91] к оперону другого типа (у эукариот) [55, 92] и возможной «инволюции» отдельных оперонов в раковых клетках [1].

Можно сформулировать в порядке обсуждения несколько общих положений.

1. Теперь уже известно, что у прокариот ген-регулятор представляет собой уникальную последовательность, расположенную вдали от группы соответствующих структурных генов [91]. Транскрипция всех этих генов приводит к образованию мРНК для *апорепрессора* и *полицистронной* мРНК для ферментов определенного *метаболического пути* (рис. 35, А).

2. У эукариот, согласно выдвинутой гипотезе [55], в транскрипционной единице регуляторная зона примыкает непосредственно к структурной. Как полагают, регуляторная зона содержит повторы, а структурная состоит из уникальной последовательности. Так называемая гетерогенная РНК (НпРНК, или пре-мРНК) представляет собой копию обеих зон и после процессинга превращается

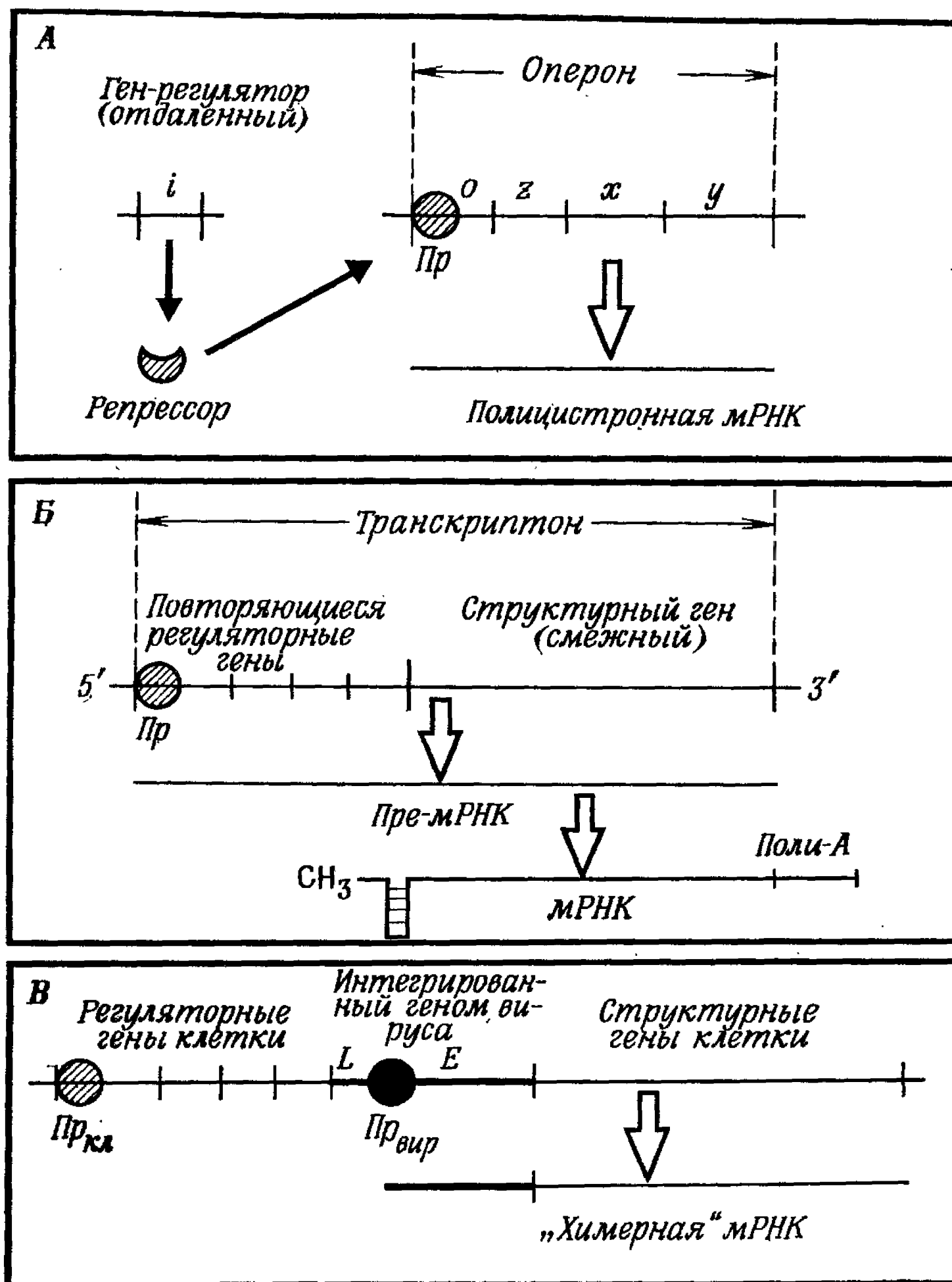
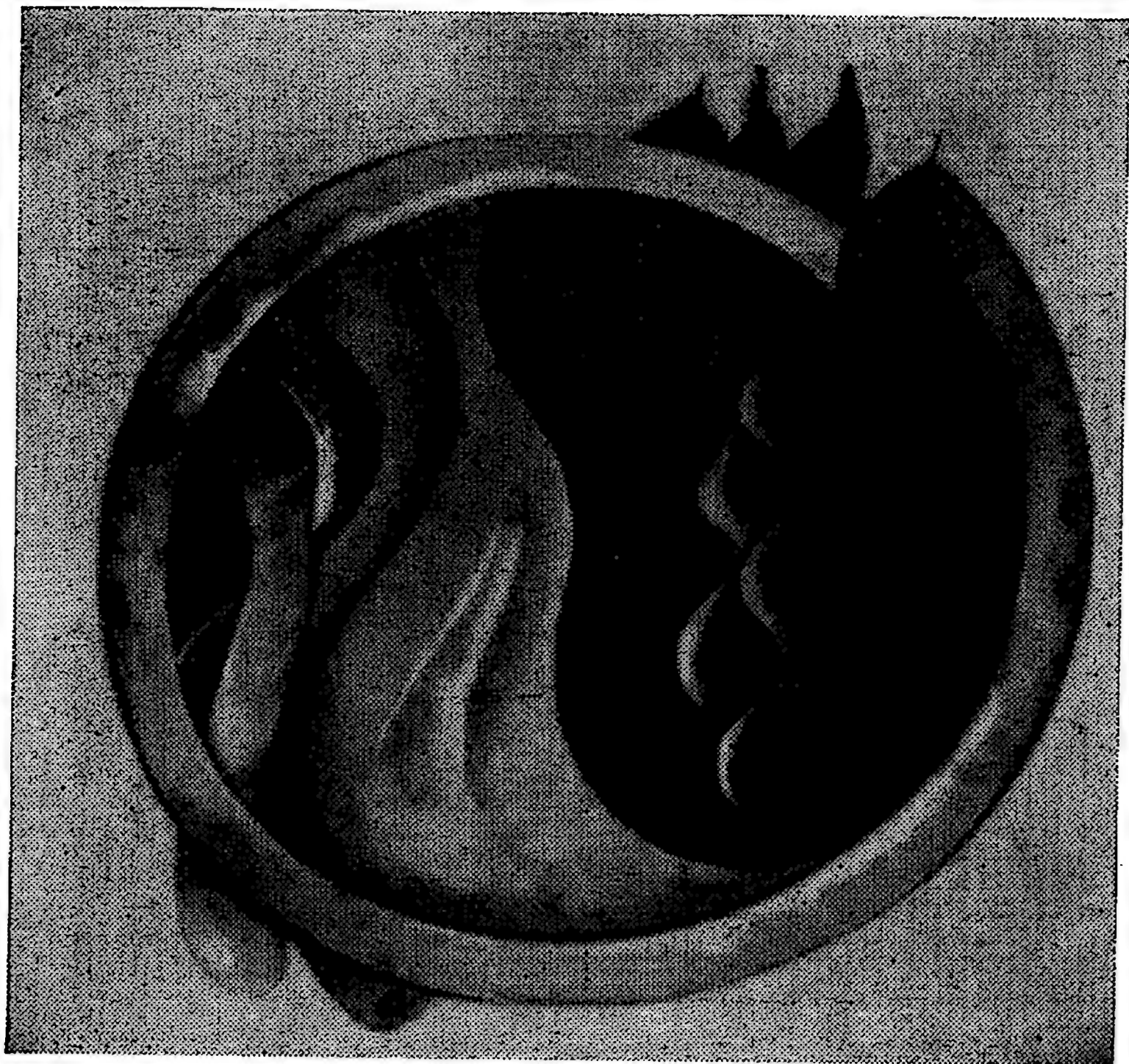


Рис. 35. Эволюция оперона. А. Классическая модель оперона у бактерий [91]. Б. Гипотеза о структуре оперона у высших организмов [55]. В. Гипотеза об «инволюции» некоторых оперонов в трансформированных клетках [1]. Pr — промотор.

в *моноцистронную* мРНК, комплементарную уникальной последовательности структурного гена (рис. 35, Б).

3. Согласно нашей гипотезе [1], в трансформированных клетках мРНК некоторых транскриптонов копирует и информацию структурного гена клетки, и информацию гена интегрированного вируса. После процессинга такой пре-мРНК *sui generis* получается химерная «полицистронная» мРНК (рис. 35, В).

Итак, трансформация клеток в результате интеграции онковирусного генома, возможно, приводит к тому, что в эукариотической клетке *снова появляется* полицистронная мРНК, хотя это и касается лишь немногих транскрипционных единиц. Это было бы регрессивным путем в эволюции оперона. Другими словами, в некоторых участках ДНК раковой клетки могла бы вести себя в отношении регуляторного механизма как бактериальная ДНК [1].



Как можно было бы уничтожить только раковые клетки, сохраняя нормальную ткань?

VII. Химиотерапия рака

22. Рак возникает чаще всего у людей пожилого возраста

Исследования, проведенные недавно в различных странах Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), показали, что, если не касаться некоторых форм рака, чаще встречающихся у детей (лейкозы, опухоль Вильмса, нейробластома и др.), то в целом рак больше поражает людей пожилого возраста (табл. 1).

Таблица 1

Смертность от рака в различном
возрасте

Возраст, годы	Смертность, число случаев на 100 000 че- ловек
Менее 30	8,05
30—40	35,00
40—50	134,90
50—60	373,90
Более 60	958,00

Цифры этой таблицы, относящиеся к опухолям желудка, легких, кожи, нижней губы, молочных желез и матки, показывают, что канцерогенез, по-видимому, коррелирует с митотическим индексом, состоянием дифференцировки, стабилизацией и старением различных клеточных популяций в организме.

23. Рак возникает чаще у мужчин, чем у женщин

По данным того же исследования ВОЗ, смертность от заболевания раком среди мужчин во всем мире выше, чем среди женщин (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение смертности от рака
у мужчин и у женщин
(число случаев на 100 000 человек)

Возраст, годы	Мужчины	Женщины
Менее 30	8,9	7,2
30—40	32,9	37,3
40—50	148,5	131,3
50—60	461,0	286,8
Более 60	1224,8	692,2

Цифры этой таблицы, конечно, не говорят о том, что клетки тканей мужского организма более подвержены онкогенезу, чем клетки женского организма, — хотя бы потому, что характер изменения смертности с возрастом у обоих полов одинаков. Однако эти цифры позволяют сделать два предположения: с одной стороны, заметная разница может быть результатом различий в условиях труда мужчин и женщин (и, следовательно, зависит от внешних факторов); с другой стороны, у мужчин и женщин может существовать различие в чувствительности клеток и органов к этиопатогенным факторам, в *гормональном балансе*, в защитных механизмах генетического типа (*репарация*), иммунологического типа и т. п.

24. Рак поражает преимущественно определенные органы

При статистическом анализе частоты рака различной локализации можно видеть, что как в мужском, так и в женском организме чаще всего поражаются лишь некоторые органы (табл. 3).

Приведенные данные показывают, что примерно в 75% случаев как у мужчин, так и у женщин рак возникает только в четырех органах (у мужчин это желудок, легкие, кожа, нижняя губа; у женщин — желудок, кожа, матка, молочная железа).

Таблица 3

Частота опухолей различных органов
у мужчин и женщин

Опухоль	Частота, %	
	мужчины	женщины
Рак желудка	35,4	25,8
Рак кожи	11,1	14,2
Рак легких	17,1	
Рак нижней губы	20,9	
Рак матки		21,1
Рак молочной железы		9,5
Суммарная частота .	74,5	70,6

Хотя ДНК во всех клетках организма одинакова, ясно, что ее тонкая организация (структурные видоизменения, например метилирование) и процессы ее репарации, от которых, возможно, зависит предрасположение того или иного органа к канцерогенезу, могли бы быть различными в клеточных популяциях разных тканей.

25. Химиотерапия рака

К химиотерапии наиболее распространенных опухолей, вроде упомянутых выше (а также и всех остальных), обращены внимание врачей и надежды больных. Однако фундаментальная наука не всегда находит простые и легкие пути практического применения своих достижений. Пока еще не созданы препараты, по-настоящему эффективные при лечении рака. И тем не менее в химиотерапии имеется определенный прогресс. В отдельных случаях противораковая химиотерапия — сама по себе или в сочетании с хирургическим вмешательством или облучением — может привести к благоприятному исходу. В 1948 г. Сидней Фарбер начал применять *аминоптерин* при острых лейкозах у детей, открыв дорогу для успешного ис-

пользования химиотерапевтических препаратов не только при раковых заболеваниях крови, но и при обычных опухолях.

Можно вспомнить, что во многих случаях лимфома Бёркита хорошо лечится *циклофосфамидом*, хориокарцинома — *метотрексатом*, карцинома эндометрия — *гормонами*; при опухоли Вильмса, саркоме Юинга, лимфогрануломатозе (болезни Ходжкина) хорошие результаты дает сочетание химиотерапии с хирургией и лучевой терапией. Многие формы заболеваний, при которых ранее применялось в основном облучение, например хронические миелоидные лейкозы, сегодня успешно лечатся химиопрепаратами — *бусульфаном*, *оксимочевиной*, *6-меркаптопурином*. Подобных примеров можно привести и больше. Следует отметить, что пока врачи ориентированы на применение химиотерапии преимущественно на начальных этапах метастазирования.

Мы не можем подробно останавливаться на классификации существующих противораковых препаратов, но следует все же подчеркнуть, что к химиопрепаратам, как правило, чувствительны клетки, находящиеся в митотическом цикле, а не в состоянии покоя (рис. 36). В связи с этим Брус, Микер и Валериот подразделяют противораковые средства на *радиомиметические*, *циклоспецифические* и *фазоспецифические*.

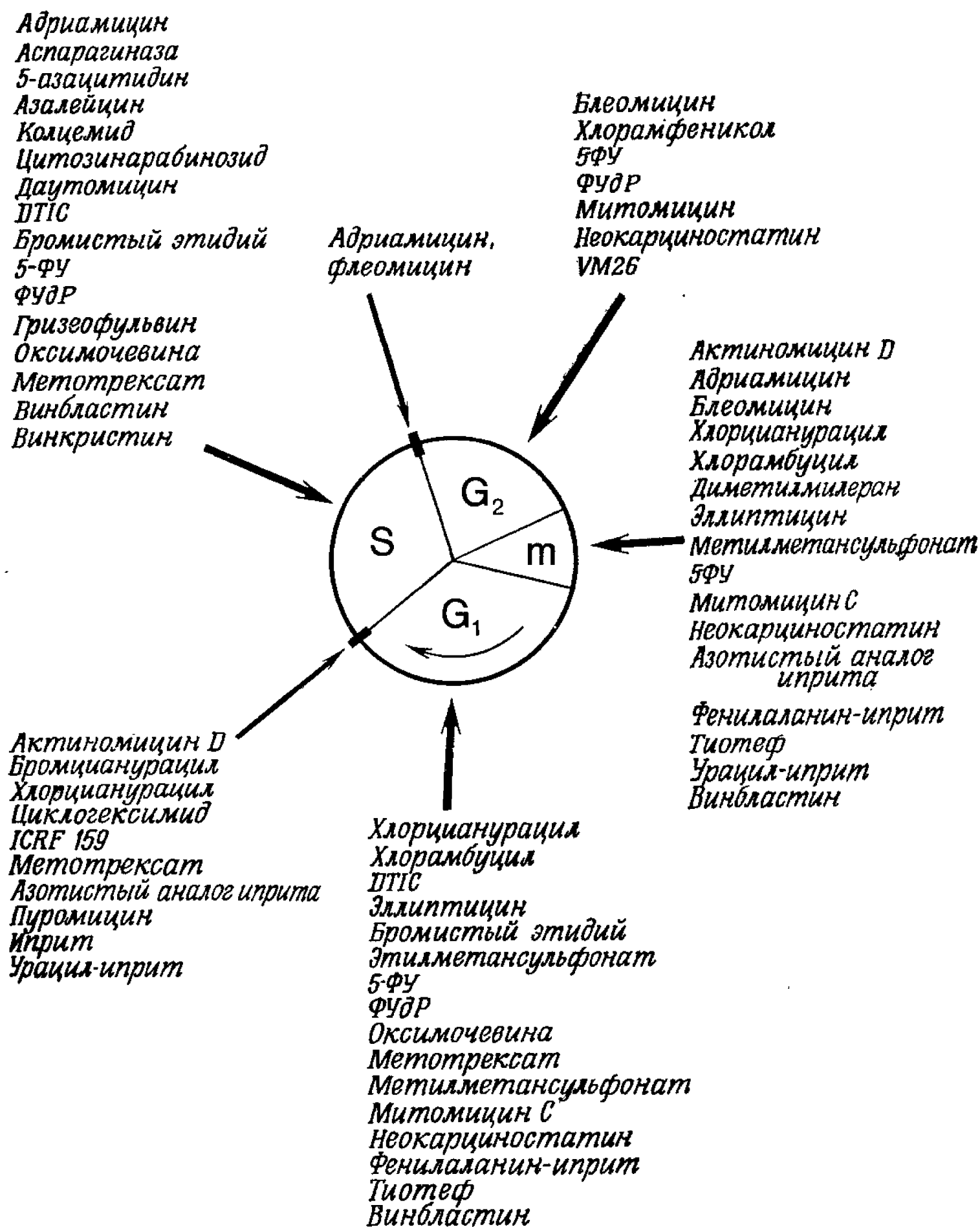
По механизму действия противоопухолевые препараты можно подразделить, с учетом результатов исследования клеточного цикла, на ингибиторы синтеза ДНК, РНК и белков. Имеются антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пуринов и пиримидинов, алкилирующие агенты, вещества, подавляющие транскрипцию, действующие на нити веретена и т. д.

Проблему химиотерапии усложняет то, что перечисленные препараты оказывают действие не только на опухолевые, но и на нормальные клетки, особенно на клетки костного мозга, кишечного эпителия и половых желез. Именно поэтому необходимо точно выяснить время дупликации нормальных и опухолевых клеток [7, 8].

Возможно, что оптимальная схема химиотерапии опухолей с одновременным применением синхронизирующих агентов, особенно так называемая *полихимиотерапия* —

комбинированное применение препаратов-синергистов в менее токсичных дозах, — позволили бы более рационально использовать, так сказать, физиологическую уязвимость клеток, находящихся в митотическом цикле.

Можно думать, что изучение действия противоопухолевых веществ на культурах клеток, с одной стороны, и



на животных — с другой, позволит разработать более точные, а потому и более эффективные методы их применения в клинике.

26. Как можно воздействовать только на опухолевые клетки!

Несмотря на реальные успехи химиотерапии многих видов злокачественных опухолей, нужно еще раз подчеркнуть, что главная проблема в лечении рака — это избирательное уничтожение опухолевых клеток при сохранении нормальных клеток. Нам еще далеко до решения этой проблемы, хотя ею занимаются как медики, так и биологи.

Описан интересный эксперимент, проведенный на клеточных культурах *in vitro*. Был использован тот факт, что некоторые вещества способны блокировать развитие не-трансформированных клеток на определенной фазе кле-

Рис. 36. Классификация веществ с фазоспецифическим действием, которые можно было бы использовать для полихимиотерапии опухолей [8]. Комбинированная химиотерапия предусматривает сочетание различных препаратов. *Алкилирующие соединения* (метансульфонаты, производные азопирита и др.) обменивают алкильные группы на атомы водорода органических молекул; механизм их антирепликативного действия состоит в образовании между двумя цепями ДНК мостиков, препятствующих деспирализации ДНК. *Антиметаболиты* (антифолаты, антипурины, антипиримидины и т. д.), обладая структурным сходством с естественными субстратами, затрудняют функционирование последних: когда антиметаболит занимает первичные или вторичные центры фермента, эти центры не могут реагировать с коферментом или с естественным субстратом. *Противоопухолевые антибиотики* (актиномицин, митомицин, адриамицин, блеомицин и др.) разнородны по своей структуре; в большинстве случаев они взаимодействуют с ДНК и препятствуют таким образом синтезу РНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы. *Ингибиторы митоза* (колцемид, колхицин, винкристин и др.) — цитостатические вещества растительного происхождения. Обычно они действуют на митотическое веретено, вызывая серьезное повреждение хромосом и остановку митоза в метафазе. Есть также много других веществ с различным механизмом действия. Например, оксимочевина ингибирует синтез ДНК, подавляя превращение рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды.

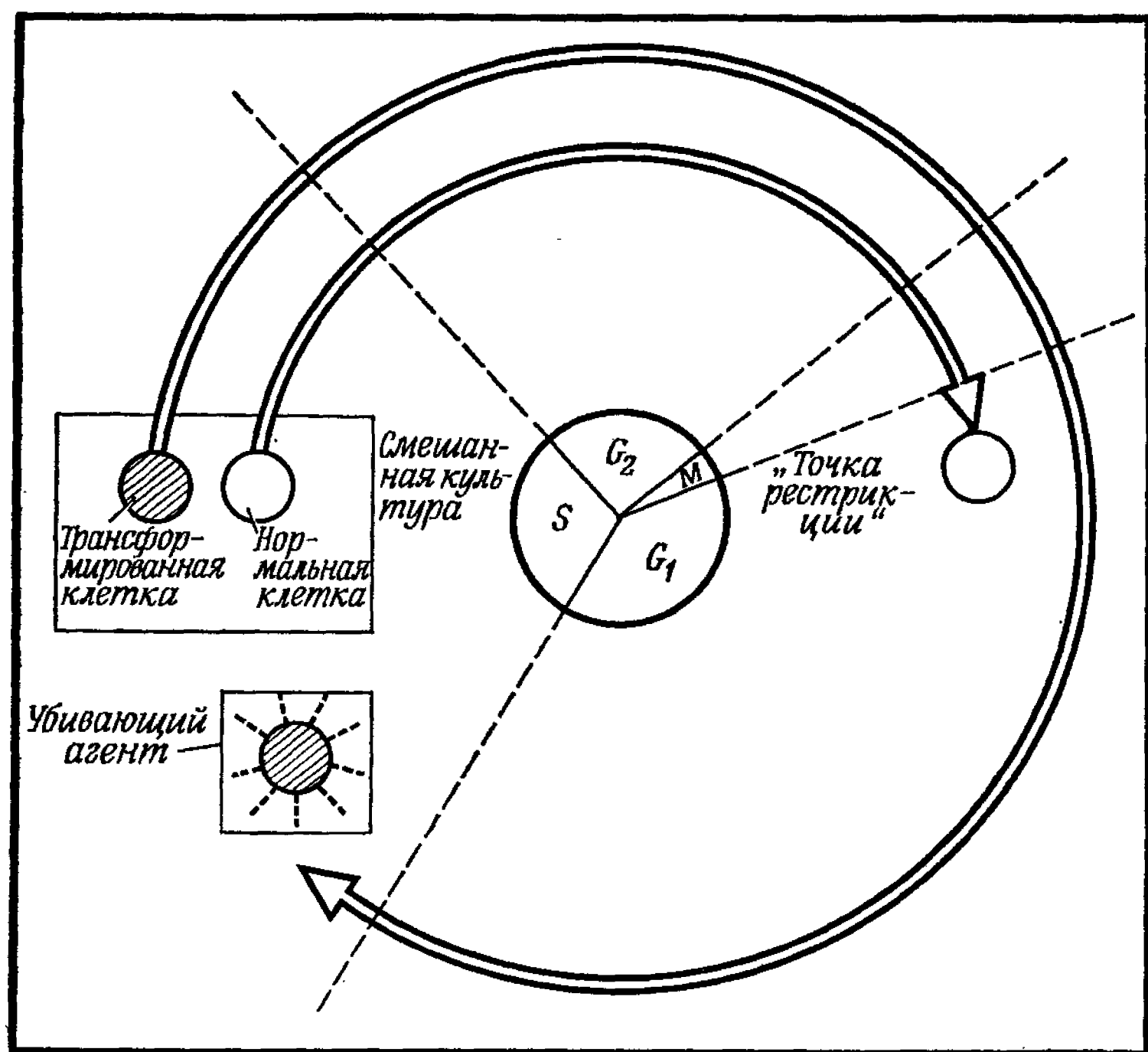


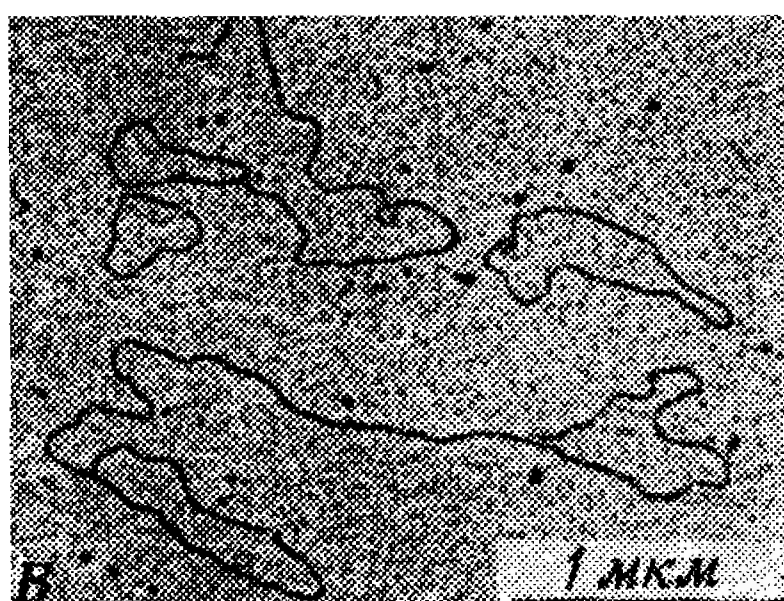
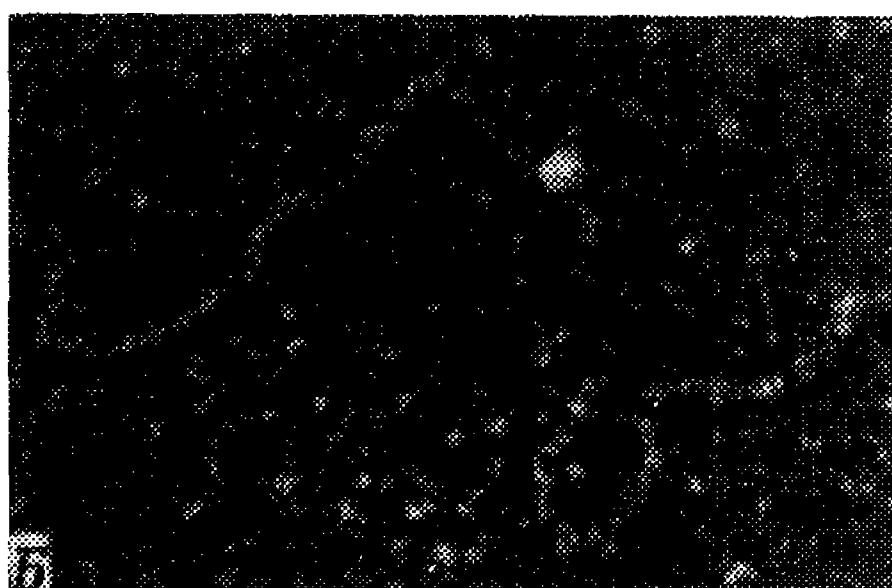
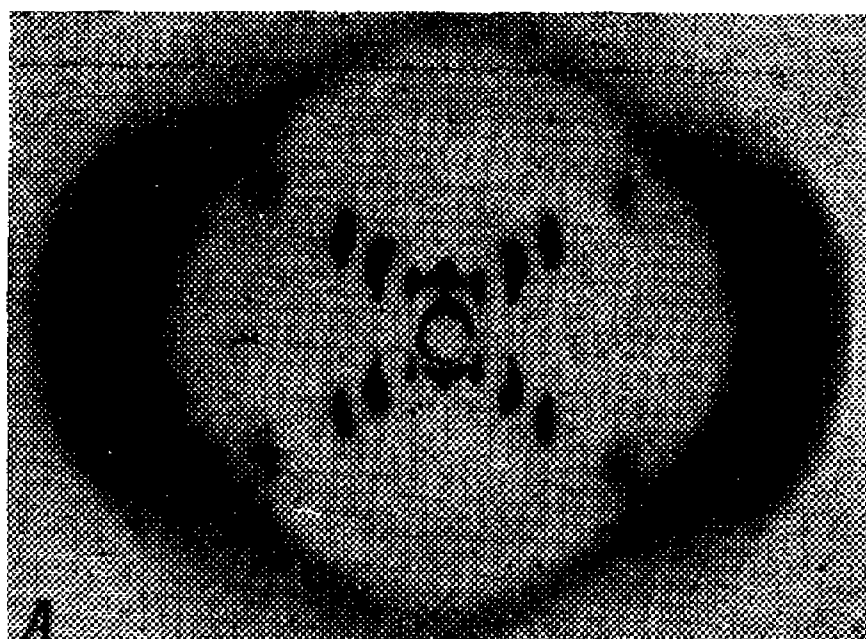
Рис. 37. Схема «комбинированной химиотерапии» в синхронной культуре, содержащей нормальные и трансформированные клетки. Нормальные клетки 3Т3 и такие же клетки, трансформированные вирусом SV40, могут быть «разобщены» по фазе митотического цикла с помощью веществ (кофеин и др.), которые блокируют развитие нормальных клеток в определенной фазе, после чего опухолевые клетки могут быть элиминированы токсическими агентами (оксимочевинной и т. п.) в последующей фазе интеркинеза.

точного цикла (так называемой точке рестрикции, restriction point) [93], тогда как кинетика роста трансформированных клеток при этом не изменяется. Опухолевую ткань можно сравнить со смешанной культурой, состоящей из линии нормальных клеток и линии трансформированных клеток.

На рис. 37 показана схема эксперимента, проведенного на такого рода смешанной культуре. Те и другие клет-

ки — трансформированные и нормальные — были синхронизированы параллельно. Затем нормальные клетки были остановлены на некоторое время в точке рестрикции. Такую культуру подвергали воздействию агента, специфичного к определенной фазе митотического цикла, отличной от фазы, в которой были остановлены нормальные клетки. Фазоспецифический препарат, убивающий трансформированные клетки, и препарат, останавливающий нормальные клетки в точке рестрикции, отмывали от клеток чистой культуральной средой. После этого в культуре оставались живыми только нормальные клетки.

Разумеется, результаты этого опыта должны быть подтверждены на многих других системах *in vitro*, прежде чем можно будет перейти к клиническим экспериментам с использованием метода синхронизации клеток *in situ* [94].



А. Рентгенограмма ДНК (R. E. Franklin, *Nature*, 171, 740, 1953).
 Б. Электронная микрофотография репрессора, связанного с промото-
 ром *Lac*-оперона бактерии [4]. В. Гибридный геном «мини-клетки»
 (J. Inselburg, M. Fuke, *Science*, 169, 590, 1970).

VIII. Заключение

В описанных выше экспериментах (рис. 16, 22, 28 и др.) была сделана попытка сопоставить особенности клеточной кинетики с количественными данными, получаемыми при анализе очищенных фракций макромолекул. Мы стремились создать модель, которая отражала бы осуществление основной схемы «ДНК→РНК→Белок» в связи с хронологией клеточного цикла в нормальных условиях и при вирусной инфекции, литической и онкогенной. Полученная модель свидетельствует, по-видимому, о наличии ряда закономерностей, управляющих, если можно так выразиться, «геометрией» внутреннего мира эукариотической клетки (рис. 28). Протекающие в клетке процессы были рассмотрены в связи с проблемами *генетической инженерии* и *химиотерапии рака*. Что касается практического «выхода» подобных исследований, нельзя отрицать, что здесь существует ряд сложностей [95—100]. Так, попытки встроить «чужеродный» геном в геном клетки могли бы привести к изменению нормальных процессов развития живой системы. Это, вероятно, могло бы быть использовано не только в интересах человека, его здоровья и существования, но и против него. И хотя этические проблемы еще не могут быть решены однозначно, мы должны не только изучать внутренний мир клетки и действующие в нем закономерности, но и исследовать перспективы изменения этого мира в направлении, полезном для человека.

Список литературы

1. *Volpe P.* The gene expression during the cell life cycle. In "Horizons in Biochemistry and Biophysics" (Quagliariello et al., eds.), Addison-Wesley Publishing Comp., Reading, USA, Vol. 2, pp. 285—340 (1976).
2. *Napolitano G.* Ricerca, riforma e sviluppo economico. Quaderni di Politica ed Economia, 5, 7—14 (1972).
3. *Porter K. R., Fonte V., Weiss G.* A scanning microscope study of the topography of HeLa cells. Cancer Res., 34, 1385—1394 (1974).
4. *Watson J. D.* Molecular biology of the gene, Benjamin, New York, USA, Second edition, pp. 1—662 (1970).
5. *Volpe P., Eremenko T.* Studies on cell ilfe cycle. Proc. 3rd Meeting Eur. Study Group Cell Prolif. (UNESCO), pp. 66 (1970).
6. *Howard A., Pelc S. R.* Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, 6, suppl., 261—273 (1953).
7. *Cajano A., Perrone V., Pergola M.* Terapia medica delle neoplasie. Riforma Medica, 46, 3—28 (1972).
8. *Hill B. T., Baserga R.* The cell cycle and its significance for cancer treatment. Cancer treatm. Res., 2, 159—175 (1975).
9. *Dustin P.* Cell differentiation and carcinogenesis: a critical review. Cell tissue kinetics, 5, 519—533 (1972).
10. *Epifanova O. I., Terskikh V. V.* On the resting periods in the cell life cycle. Cell tissue kinetics, 2, 75—82 (1969).
11. *Goldin A., Venditti J. M., Mantel N.* Combination chemotherapy: basic considerations. In "Antineoplastic and immunosuppressive agents" (Sartorelli & Johns, eds.), Springer-Verlag, Berlin, vol. 1, pp. 411—448 (1974).
12. *Volpe P., Giuditta A.* Kinetics of RNA labelling in fractions enriched with neuroglia and neurons. Nature, 216, 154 (1967).
13. *Volpe P., Giuditta A.* Biosynthesis of RNA in neuron and glia-enriched fractions. Brain Res., 6, 228—240 (1967).
14. *Hyden H., Lange P. W.* A kinetic study of the neuron-glia relationship. J. Cell Biol., 13, 233—237 (1962).
15. *Певзнер Л. З.* Функциональная биохимия невроглиальных клеток, изд-во «Наука», Л., стр. 1—200 (1972).
16. *Moscona A.* How cells are linked with each other. Scientific Amer., 205 (1961).
17. *Casola L., Agranoff B. W.* Studies on RNA in goldfish brain. Brain Res., 10, 227—238 (1968).

18. *Rose S. P. R.* Some properties of isolated neuronal cell fractions. *J. Neurochem.*, **16**, 1319—1328 (1969).
19. *Lovtrup-Rein H.* Synthesis of nuclear RNA in nerve and glial cells. *J. Neurochem.*, **17**, 853—863 (1970).
20. *Jarlstedt J., Hamberger A.* Patterns of labelling characteristics in neuronal and glial RNA. *J. Neurochem.*, **18**, 921—930 (1971).
21. *Roberts S.* Protein synthesis, in: "Handbook of Neurochemistry" (Lajtha, ed.), Plenum Press, New York, USA, Ch. 1, pp. 19—41 (1972).
22. *Mandel P., Jacob M.* RNA metabolism, in "Handbook of Neurochemistry" (Lajtha, ed.), Plenum Press, Now York, USA, Ch. 4, pp. 180—215 (1972).
23. *Певзнер Л. З.* Анализ единиц нейрон — нейроглия с помощью количественных цитохимических методов. В кн.: «Успехи нейрохимии», под ред. Кребса, изд-во «Наука», Л., стр. 140—152 (1974).
24. *Jakoubek B.* Brain functions and macromolecular synthesis. Pion Limited, London, Ch. 3, p. 60 (1974).
25. *Помазанская Л. Е.* Методы выделения фракций, обогащенных нейронами и нейроглиальными клетками, и биохимические данные, полученные с помощью этого метода. В кн.: «Успехи нейрохимии», под ред. Кребса, изд-во «Наука», Л., стр. 153—164 (1974).
26. *Summers D. F.* Animal virus replication, in "Macromolecular Synthesis and Growth" (Malt, ed.), Little Brown Comp., Boston, USA, Ch. 6, pp. 149—184 (1967).
27. *Koch A. S., Volpe P.* Initiation of virus infection, in "International Virology" (Melnick, ed.), Karger, Basel-New York, vol. 2, Ch. 28, pp. 277—282 (1972).
28. *Meselson M., Stahl F. N.* The replication of RNA, in "Escherichia coli". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **44**, 671—678 (1958).
29. *Edenberg H., Hanawalt P.* Size of repair patches in the DNA of ultraviolet-irradiated HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 361—372 (1972).
30. *Volpe P., Eremenko T.* A method for measuring cell cycle phases in suspension cultures, in "Methods in cell Biology" (Prescott, ed.), Academic Press, New York, USA, vol. 6, Ch. 4, pp. 113—126 (1973).
31. *Kornberg A.* The Synthesis of DNA. *Scient. Amer.*, vol. 219, October, 64—78 (1968).
32. *Richardson C. C.* Enzymes in DNA metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 795—840 (1969).
33. *Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K., Sugimoto K., Sugino A.* Mechanism of DNA chain growth: I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Biochem.*, **59**, 598—605, (1968).
34. *Еременко Т., Вольне П.* Синтез ядерной и цитоплазматической ДНК в митотическом цикле. В кн.: «Клеточное ядро», под ред. Збарского и Георгиева. Изд-во «Наука», М., стр. 256—258 (1972).
35. *Volpe P., Eremenko T.* Nuclear and cytoplasmic DNA synthesis

- during the mitotic cycle of HeLa cells. *Eur. J. Biochem.*, **32**, 227—232 (1973).
36. Gold M., Hurwitz J., Anders M. The enzymatic methylation of RNA and DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 104—110 (1963).
 37. Scarano E., Iaccarino M., Grippo P., Winckelmans D. On methylation of DNA during development of the sea urchin embryo. *J. Mol. Biol.*, **14**, 603—606 (1965).
 38. Ванюшин Б. Ф., Немеровский Л. Е., Клименко В. В., Васильев В. К., Белозерский А. Н. The 5-methylcytosine in DNA of rats. *Gerontol.*, **19**, 138—152 (1973).
 39. Volpe P., Eremenko T. Preferential methylation of regulatory genes in HeLa cells. *FEBS Letters*, Special issue, **44**, 121—126 (1974).
 40. Holliday R., Pugh J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, **187**, 226—232 (1975).
 41. Borek E. Model for differentiation based on DNA modifying enzymes. *Science*, **190**, 591—592 (1975).
 42. Fujimoto D., Srinivasan P., Borek E. On the nature of DNA methylases. *Biochemistry*, **4**, 2849—2855 (1965).
 43. Kalousek F., Morris N. R. The purification and properties of deoxyribonucleic acid methylases from rat spleen. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1157—1163 (1969).
 44. Doskocil J., Sormova Z. The occurrence of 5-methylcytosine in bacterial deoxyribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 513—515 (1965).
 45. Geraci D., Eremenko T., Cocchiara R., Granieri A., Scarano E., Volpe P. The in vivo and in vitro methylation of DNA in synchronized HeLa cells. IX Intern. Congr. Biochem. Stockholm, Abstr., 3m64, 190 (1973).
 46. Scarano E. Enzymatic modification of DNA and embryonic differentiation. *Ann. Embryol. Morphol.*, Suppl. 1, 51—61 (1969).
 47. Geraci D., Eremenko T., Cocchiara R., Granieri A., Scarano E., Volpe P. Correlation between synthesis and methylation of DNA in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 353—361 (1974).
 48. Friedman D. L. On the mechanism of DNA replication in isolated nuclei from HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **353**, 447—462 (1974).
 49. Adams R. L. P. Newly synthesized DNA is not methylated. *Biochim. Biophys. Acta*, **335**, 365—373 (1973).
 50. Watson J. D. The eukaryotic chromosome, in "Molecular Biology of the Gene", Benjamin, New York, 2nd ed., pp. 529—533 (1970).
 51. Eremenko T., Granieri A., Scarano E., Volpe P. Fractionation of methylated nuclear DNA in HeLa cells. Xth FEBS Meeting, Paris, Abstr. n 130 (1975).
 52. Volpe P., Granieri A., Eremenko T. Negli eucarioti i geni si metilano ordinatamente prima della replica. XII Congr. Soc. Ital. Biof. Biol. Mol. Pavia, Atti, p. 49 (1975).
 53. Karijord O., Oyen T. Study of a haploid yeast strain with an unusually high rDNA content. II. Fractionation of the DNA in prepa-

- relative Ag^+ — Cs_2SO_4 density gradients. *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 255—265 (1975).
54. Aarstad K., Oyen B. On the distribution of 5S RNA cistrons on the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **51**, 227—231 (1975).
55. Георгиев Г. П. On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells. *J. Theor. Biol.*, **25**, 473—490 (1969).
56. Darnell J. E., Jelinek W., Molloy G. R. Biogenesis of mRNA: genetic regulation in mammalian cells. *Science*, **181**, 1215—1221 (1973).
57. Watson J. D. The nucleolar location of rRNA synthesis, in "Molecular Biology of the Gene", Benjamin, New York, 2nd ed., pp. 541—544 (1970).
58. Henikoff S., Heywood J., Meselson M. Orientation of repeating units in *Xenopus* chromosomal ribosomal DNA. *J. Mol. Biol.*, **85**, 445—450 (1974).
59. Volpe P., Menna T., Eremenko T. RNA transcription and processing as a function of the cell cycle. *Bull. Mol. Biol. Med.*, **1**, 18—28 (1976).
60. Pfeiffer S. E., Tolmach L. J. RNA synthesis in synchronously growing population of HeLa S₃ cells. I. Rate of total RNA synthesis and its relationship to DNA synthesis. *J. Cell Physiol.*, **71**, 77—94 (1968).
61. Dubnau D., Smith I., Marmur J. Gene conservation in *Bacillus* species. II. The location of genes concerned with the synthesis of ribosomal components and soluble RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 724—730 (1965).
62. Смоленская И. Н. Роль РНК в контроле митотического цикла. В кн.: «Клеточный цикл», под ред. Епифановой, изд-во «Наука», М., стр. 38—71 (1973).
63. Георгиев Г. П. On the regulation of transcription in higher organisms, in "Advances in Cytopharmacology" (Clementi & Ciccarelli, eds.), Raven Press, New York, USA, pp. 41—48 (1971).
64. Eremenko T., Volpe P. Polysome translational state during the cell cycle. *Eur. J. Biochem.*, **52**, 203—210 (1975).
65. Spector D. H., Baltimore D. Polyadenylic acid on poliovirus RNA. *Virology*, **67**, 498—505 (1975).
66. Fenwick M. L., Wall M. J. Factors determining the site of synthesis of poliovirus proteins: the early attachment of virus particles to endoplasmic membranes. *J. Cell Sci.* **13**, 403—413 (1973).
67. Eremenko T., Benedetto A., Volpe P. Virus infection as a function of the host cell life cycle: replication of poliovirus RNA. *J. Gen. Virol.*, **16**, 61—68 (1972).
68. Eremenko T., Benedetto A., Volpe P. Poliovirus replication during HeLa cell life cycle. *Nature New Biology*, **327**, 114—116 (1972).
69. Volpe P., Eremenko T., Benedetto A. Cell cycle dependency of the poliovirus RNA replication. VIII FEBS Meeting, Amsterdam, Abstr., **85**, 707 (1972).
70. Bienz K., Egger D., Wolff D. A. Virus replication, cytopathology,

- and lysosomal enzyme response of mitotic and interphase Hep-2 cells infected with poliovirus. *J. Virol.*, **11**, 565—574 (1973).
71. Koch A. S., Feher G. The possible nature of the chance-event in initiation of virus infection at the cellular level. *J. Gen. Virol.*, **18**, 319—327 (1973).
 72. Suarez M., Contreras G., Fridlender B. Multiplication of Coxsackie B₁ virus in synchronyzed HeLa cells. *J. Virol.*, **16**, 1337—1339 (1975).
 73. Pages J., Mantenil S., Stehelin D., Fiszman M., Marx M., Girard M. Relationship between replication of Simian virus 40 DNA and specific events of the host cell cycle. *J. Virol.*, **12**, 99—107 (1973).
 74. Hampar B., Tanaka A., Nonoyama M., Derge J. G. Replication of the resident repressed Epstein-Barr virus genome during the early S-phase (S₁-period) of nonproducer Raji cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 631—633 (1974).
 75. Kaplan J. C., Keinman L. F., Black P. H. Cell cycle dependence of Simian virus 40 induction from transformed hamster cells by ultraviolet irradiation. *Virol.*, **68**, 215—220 (1975).
 76. Lwoff M. A., Lwoff M. L'action de la guanidine sur le développement du poliovirus. *Compt. rend. Acad. Sci., Paris*, **256**, 5001—5004 (1963).
 77. Mosser A. G., Caliguiri L. A., Scheid A. S., Tamm I. Chemical and enzymatic characteristics of cytoplasmic membranes of poliovirus-infected HeLa cells. *Virol.*, **47**, 30—38 (1972).
 78. Koch A. S., Eremenko T., Benedetto A., Volpe P. A guanidine sensitive step of the poliovirus RNA replicative cycle. *Intervirology*, **4**, 221—225 (1975).
 79. Westphal H., Dulbecco R. Viral DNA in polyoma- and SV40-transformed cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 1158—1165 (1968).
 80. Sambrook J., Westphal H., Srinivasan P. R., Dulbecco R. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 1288—1295 (1968).
 81. Volpe P., Eremenko T. Sul probabile sito per il genoma oncovirale nell'ambito del transcripton. XI Congr. Soc. Ital. Cancerol., Napoli, Atti, p. 48 (1975).
 82. Volpe P., Eremenko T. On the probable target for oncornavirus RNA on host cell DNA. IIIrd Intern. Congr. Virol., Madrid., Abstr. C., 116 (1975).
 83. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature*, **266**, 209—211 (1970).
 84. Temin H. M., Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **266**, 211—213 (1970).
 85. Gershenson S., DNA synthesis in RNA virus-infected cells. In "Genetics today". (Proceedings of the 2nd international congress of genetics), p. 1 : 30 (1963).
 86. Zhdanov V. M. Integration of viral genomes. *Nature*, **256**, 471—473 (1975).
 87. Temin H. Homology between RNA from Rous sarcoma virus and

- DNA from Rous sarcoma virus-infected cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 323—329 (1964).
88. *Harel L., Harel J., Huppert J.* Partial homology between RNA from Rauscher mouse leukemia virus and cellular DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 44—49 (1967).
89. *Wilson D. E., Baker H.* Hybridization of Avian myoblastosis virus RNA with DNA from chick embryo cells. *Virology*, **33**, 754—757 (1967).
90. *De La Maza L. M., Faras A., Varmus H., Vogt P. K., Yunis J. J.* Integration of avian sarcoma virus specific DNA in mammalian chromatin. *Exptl. Cell. Res.*, **93**, 484—487 (1975).
91. *Jacob F., Monod J.* Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of protein. *J. Mol. Biol.*, **3**, 318—356 (1961).
92. *Tomkins G. M., Ames B. N.* The operon concept in bacteria and in higher organisms. *Nat. Cancer Inst. Monographs.*, **27**, 221—234 (1966).
93. *Pardee A. B.* A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1286—1290 (1974).
94. *Nicolini C.* The principles and methods of cell synchronization in cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta*, **458**, 243—282 (1976).
95. *Cohen S. N.* Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3240—3244 (1973).
96. *Ebina T., Miao R., Watanabe Y.* Transfer of chromosomal material. *Exptl. Cell Res.*, **28**, 203—206 (1974).
97. *Wade N.* Regulating recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, February, p. 29 (1976).
98. *Wade N.* Imponderables of genetic engineering. *Trends in Biochemical Sciences*, April, p. 76—77 (1976).
99. *Murray K.* Biochemical transformation of genetic information. *Trends in Biochemical Sciences*, May, p. 100—103 (1976).
100. *Smith K. B.* Genetic engineering—techniques and potential. *Trends in Biochemical Sciences*, June, p. 135—136 (1976).

Оглавление

Предисловие к русскому переводу	5
Предисловие	6
I. Введение	9
1. Как выглядят клетки, культивируемые <i>in vitro</i>	10
2. Микрокосм эукариотической клетки	13
3. «Центральная догма» биологии	14
4. Клеточный цикл	17
5. Опухолевая ткань	18
6. Химиотерапевтический подход в лечении рака	21
7. От нейрохимии к вирусологии	21
II. Репликация, репарация и модификация ДНК	26
8. Когда происходит репликация и когда — репарация ядерной ДНК?	26
9. Два митохондриальных цикла в одном клеточном цикле?	29
10. Модифицируется ли ДНК?	31
11. Когда и какие цепи ДНК метилируются?	33
12. Метилирование ДНК — процесс неравномерный и дифференцированный	37
13. Не происходит ли избирательного метилирования повторяющихся последовательностей регуляторных генов?	39
III. Транскрипция и созревание РНК	41
14. Процесс транскрипции у эукариот	41
15. Временная модель трансляции и созревания РНК	44
IV. Трансляция	53
16. Регулирование трансляции на протяжении клеточного цикла	53
17. Макромолекулярные синтезы в клеточном цикле пересекаются в системе «орбит»	58
V. Литическая вирусная инфекция	62
18. Всегда ли возможно заражение клетки вирусом, вызывающим литическую инфекцию?	62
19. Нарушение хронологии процессов трансляции в клетке при литической вирусной инфекции	66

VI. Онкогенная вирусная инфекция	69
20. Новая экспериментальная база для генетической инженерии	69
21. Эволюция и инволюция оперона	74
VII. Химиотерапия рака	78
22. Рак возникает чаще всего у людей пожилого возраста .	78
23. Рак возникает чаще у мужчин, чем у женщин	78
24. Рак поражает преимущественно определенные органы .	79
25. Химиотерапия рака	80
26. Как можно воздействовать только на опухолевые клетки?	83
VIII. Заключение	87
Список литературы	88

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

П. Вольпе

БИОХИМИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Редактор Ю. И. Лашкевич
Художник П. Ф. Быков
Художественный редактор В. И. Бисенгалиев
Технический редактор Г. Б. Алюлина
Корректоры Н. В. Серегин, Ю. Г. Яникова

ИБ № 1574

Сдано в набор 05.05.78. Подписано к печати 04.01.79. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага типографская № 2. Латинская гарнитура. Высокая печать. Объем 1,5 бум. л., 5,04 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 4,32. Изд. № 4/9942. Тираж 8500 экз. Зак. 366. Цена 30 коп.

Издательство «Мир».
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.



PIETRO VOLPE

Biochimica del ciclo cellulare

problemi di cancerogenesi e di chemioterapia

30 ron.

